

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



TESIS DOCTORAL

**Factores neuroprotectores y redox en el desarrollo del
fenotipo neurológico de la malaria cerebral murina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Linares Gómez

Directores

José Manuel Bautista Santa Cruz
Amalia Díez Martín

Madrid, 2014

© María Linares Gómez, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

FACTORES NEUROPROTECTORES Y REDOX EN EL DESARROLLO DEL FENOTIPO NEUROLÓGICO DE LA MALARIA CEREBRAL MURINA

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universidad Complutense de Madrid

María Linares Gómez
Madrid, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

D. José Manuel Bautista Santa Cruz, doctor en Veterinaria y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y **Dña. Amalia Diez Martín**, doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: **"Factores neuroprotectores y redox en el desarrollo del fenotipo neurológico de la malaria cerebral murina"** que presenta María Linares Gómez, licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid con mención europea.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como directores de la mencionada tesis doctoral.

En Madrid, a 6 de Mayo de 2011

Dr. José Manuel Bautista Santa Cruz

Dra. Amalia Diez Martín

La realización de este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral para la formación de personal universitario del Ministerio de Educación y Ciencia.

LISTADO DE ABREVIATURAS

β 1: subunidad del proteasoma β 1

β 2: subunidad del proteasoma β 2

β 5: subunidad del proteasoma β 5

2D oxyblot: Inmunodetección bidimensional

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés "brain-derived neurotrophic factor"

CAT: catalasa

DNP: 2,4-dinitrofenilhidrazona

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

E-selectina: del inglés, "endothelial selectin"

FOXO1: del inglés, forkhead box O1

FOXO3: del inglés, forkhead box O3

GPX: glutathion peroxidasa

HO: hemoxigenasa

HSP: proteína de choque térmico, del inglés, "heat shock protein"

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1, del inglés "intercellular adhesion molecule-1"

IFN- γ : interferón- γ

LMP2: subunidad del inmunoproteasoma β 1i

LMP7: subunidad del inmunoproteasoma β 5i

LT- α : linfotoxina- α

MECL1: subunidad del inmunoproteasoma β 2i

NCAM: molécula celular de adhesión neural, del inglés "neural cell adhesion molecule"

PARK7: del inglés, Parkinson disease 7

PDGF: del inglés, "platelet derived growth factor"

PfEMP-1: del inglés, "erythrocyte membrane protein 1" de *P.falciparum*)

P-selectina: del inglés, platelet selectin

SOD: superóxido dismutasa

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α , del inglés "tumor necrosis factor- α "

TRX: tioredoxina

Abreviaturas

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1, del inglés "vascular cell adhesion molecule-1"

XBP1: del inglés, "X-box binding protein 1".

Las abreviaturas de los nombres de los genes están representados en minúscula y cursiva, siendo las mismas utilizadas para las proteínas que codifican.

ÍNDICE

1. SUMMARY	1
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. El problema de la malaria	9
2.2. El ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	11
2.3. Manifestaciones clínicas de la malaria en el hombre	15
2.4. Malaria cerebral	19
2.4.1. Clínica y secuelas	19
2.4.2. Patogénesis de la malaria cerebral	23
2.4.2.1. Secuestro de glóbulos rojos infectados	24
2.4.2.2. Respuesta inmune del hospedador: neuroinflamación	31
2.4.2.3. Alteraciones en la neuroprotección	37
2.4.2.4. Estrés oxidativo	42
2.5. Modelos experimentales de la malaria cerebral	49
2.5.1. El modelo murino de <i>P. berghei</i> ANKA	51
3. OBJETIVOS/OBJECTIVES	55
4. TRABAJOS EXPERIMENTALES	61
Declined expression of brain-derived neurotrophic factor correlates with neurological stages of cerebral malaria in mice	63
Proteomic approaches to identifying carbonylated proteins in brain tissue	93
Oxidative stress responses in cerebral malaria maintain the redox balance in mouse brain	117
5. DISCUSIÓN GENERAL	151
5.1. Caracterización del fenotipo neurológico progresivo de la malaria cerebral murina	153
5.2. Factores neuroprotectores en la malaria cerebral	157
5.3. Metodología oxiproteómica para la caracterización de daño oxidativo en cerebro	171
5.4. Estrés oxidativo y daño neurocognitivo en la malaria cerebral	176
5.5. Moléculas neuroprotectoras y redox como dianas terapéuticas durante la malaria cerebral	188
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	191
7. BIBLIOGRAFÍA	195



1. SUMMARY

Malaria is one of the most important global health problems and, together with tuberculosis and HIV/AIDS, is one of the three infectious diseases that has the highest impact worldwide in terms of morbidity, mortality and socioeconomic consequences. The vast majority of cases occur in Africa, where the bulk of the infections and deaths are caused by *Plasmodium falciparum*. This species is the only one producing cerebral malaria (CM) in humans, a life-threatening neurological syndrome, predominantly in children growing up in endemic areas of Africa. Among the survivors, more than 10% of the children affected by this complication develop neurological sequelae.

The pathogenesis and triggering events of CM are not well understood, but today it is accepted that the onset and severity of CM are predominantly determined by an exacerbated host inflammatory response and the capacity of the parasite to adhere to the cerebral microvasculature. Two other biochemical features have been reported critical in CM development: the alteration of neuroprotective pathways and the oxidative stress.

In order to study the implication of these events in the CM progression, a time-course protocol with four clinical stages of the disease, according to the neurological outcome, was established in a widely used experimental malaria model (C56BL6/mice infected with *P.berghei* ANKA). The neurological performance of infected mice was daily evaluated in individual mice by recording clinical symptoms of this syndrome. The test covered a wide range of behavioral and functional features and the analysis was complemented with an overall examination of the mice, including quantification of peripheral blood parasitemia. Since only motor function and coordination impairments were exhibited by 100% of the animals, these clinical features were then used to define the phases of disease progression in four stages as follows: STAGE I: no neurological symptoms in the first few days of infection; STAGE II: incipient symptoms of CM; STAGE III: appreciable neurological symptoms; and STAGE IV: severe symptoms. All animals at stage II exhibited mildly head deviation or hemi-paralysis. From this stage onwards, these symptoms worsened rapidly and at stages III and IV they were accompanied by reduced motility and weakness. The screening of mice with respect of the neurobehavioral phenotype offers a powerful tool to understand the etiology

and pathogenesis of cerebral malaria, avoiding any variation due to the heterogeneity in disease progression since mice did not present the same symptoms at the same time from the initial inoculation of *P. berghei*.

Once the four-stage protocol was established, the potential alterations of neuroprotective pathways were studied. For this purpose, the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the neurological dysfunction of CM was studied. BDNF is an important regulator of neuronal survival and synaptic plasticity. CM and its sequelae course with neuronal damage and impaired cognitive functions. Thus, BDNF expression and distribution was analysed in several brain areas during the progress of disease. Quantitative-RT-PCR assays revealed a diminished *bdnf* mRNA expression in all brain regions analyzed in parallel with CM progression. Immunohistochemical studies showed an altered BDNF axonal transport. However, western blot analyses did not reveal any change at protein level. Since proteasome disfunction blocks *bdnf* transcription and drives the accumulation of misfolded proteins, which may mask *bdnf* downregulation at protein level, proteasome and immunoproteasome subunits were further analyzed. A switch of the decreased constitutive proteasome towards the induced immunoproteasome was observed during CM. In this context, some of the cytokines accepted to participate in CM have also been reported to increase the immunoproteasome subunits. Thus, the early up-regulation of the cytokines tumor necrosis factor- α and interferon- γ observed in our studies could have also a role in the immunoproteasome induction during CM progression. Finally, neural cell adhesion molecule (NCAM), which interacts with BDNF to modulate neuronal survival and plasticity, was characterized. This molecule also presented a steadily downregulation, supporting a potential failure in the neuroprotective pathways but excluding its potential role in parasite adhesion to brain microvasculature. Together, these observations suggest a critical role of BDNF and other neuroprotective markers in the pathogenesis of CM.

Carbonyl groups are well known markers of protein oxidation, a direct consequence of oxidative stress. Before starting the second part of the thesis, the most suitable method to detect carbonyl groups in brain tissues was established by comparison of the two most widely used oxyproteomic approaches. Briefly, the carbonyl contents of individual proteins may be assessed by reacting samples with

dinitrophenylhydrazine (DNPH) before or after the two dimensional electrophoresis step. Then, carbonyl modified proteins are visualized using specific antibodies. As pre-treatment with DNPH before electrophoresis rendered a large number of carbonyl modified proteins in gels, a lower stained background and an improved reproducibility without modifying the mass spectrometry fingerprinting identification scores, this approach was chosen for further oxyproteomic analysis in brain tissues.

Further, the scenario of host oxidative stress during cerebral malaria progression was analyzed. Although altered redox equilibrium has been suggested during CM pathogenesis, some authors fail to demonstrate its implication in murine CM. These data contrast with several reported anti-oxidant experimental treatments in mice that result in protection. In order to better understand the redox factors potentially involved in the development of CM, the antioxidant defense status of several regions of the host brain during CM was studied in detail. Quantitative PCR showed an important downregulation of mice superoxide dismutase (*sod*) and catalase (*cat*) mRNA expression in parallel with the onset of the disease in all brain areas analyzed. Furthermore, gel activity assays showed a significant decrease of both, SOD and CAT, activities at the most severe CM stage. A gradual diminished expression of the antioxidant proteins thioredoxin-1 and heat shock protein 70 was also observed during CM. Parkinson disease 7 (PARK7), X-box-binding protein 1 (XBP1) and the Forkhead box protein O (FOXO) family of transcription factors regulate the expression of antioxidant enzyme genes. Thus, the above observed mRNA downregulations could be explained by the reduced expression of *park7*, *foxo1*, *foxo3* and *xbp1* detected during the progression of the disease. Next, reactive oxygen species build up and carbonyl modified proteins were also explored. Nevertheless, both markers of oxidative stress failed to vary at the most severe stage of disease, suggesting a compensatory antioxidant activity. Finally, an up-regulation of two different antioxidant enzymes, heme oxygenase-1 and glutathione peroxidase, were observed in several tissues during CM, which suggest a role for them in the removal of reactive oxygen species generated during CM progression.

The results obtained in the present thesis pointed out to a central role of neuroprotectors and antioxidant mediators during cerebral malaria progression. The gradual changes observed along the outcome of the disease suggest a critical point for the development of neurological damage. In this context, earlier and specific treatment could ameliorate CM prognosis and reduce potential neurocognitive sequelae. Finally, it should be considered that some of these mediators could be potential targets for coadjuvant therapy to antimalarial treatment in CM.



2. INTRODUCCIÓN

2.1.- EL PROBLEMA DE LA MALARIA

La malaria o paludismo es la enfermedad parasitaria más importante en el mundo debido a la alta morbilidad, mortalidad y al impacto socio-económico que ocasiona en la población humana (Enayati & Hemingway; Greenwood *et al.*, 2005). Cada año se diagnostican alrededor de 200 a 300 millones de nuevos casos de malaria, de los cuales se calcula que mueren a consecuencia de la infección aproximadamente 1 millón de personas, con una elevada morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años (WHO, 2007; WHO, 2009). Esta elevada mortalidad se debe principalmente a las complicaciones que se derivan de la misma, responsables del desarrollo de la denominada malaria severa (Mackintosh *et al.*, 2004), fundamentalmente por su forma más grave, la malaria cerebral, que es la responsable de alrededor del 80% de las muertes que suceden por esta patología infecciosa (Armah *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2001).

Cerca del 50 % de la población mundial se encuentra en zonas con riesgo de transmisión (Hay, 2004; WHO, 2009), mayoritariamente distribuidas en los países más pobres del mundo (Figura 1). Aproximadamente el 90% del daño por malaria se produce en África (Bell *et al.*, 2006; Breman *et al.*, 2004; WHO, 2009), sobre todo en la zona subsahariana. Sin embargo, áreas de Asia, América Latina, Europa del Este y otras partes de Europa también están afectadas (WHO, 2007; WHO, 2009), tratándose por tanto, de una enfermedad endémica en más de 100 países del mundo (Puente, 2005; WHO, 2009). Esta patología es responsable tanto de un sufrimiento humano incalculable como de un elevado coste sanitario y económico (por pérdida productiva), lo cual contribuye a incrementar el ciclo vicioso pobreza-enfermedad en el que se encuentran muchos de los países afectados (Sachs & Malaney, 2002).

A pesar de que el hospedador puede adquirir inmunidad frente a la malaria a través de la infección natural o experimental, aun no se ha conseguido desarrollar una vacuna eficaz contra esta enfermedad. Actualmente, se están llevando a cabo diferentes ensayos clínicos en humanos que se encuentran en distintas fases de evaluación, a partir de vacunas diseñadas frente a diversas formas del ciclo de vida de *Plasmodium*. Sin embargo, existen grandes dificultades en la obtención de una vacuna efectiva debido al complejo ciclo de vida del parásito y a su capacidad de

variación antigénica, lo que le permite unos extraordinarios mecanismos de evasión inmunitaria (Crompton *et al.*, 2011). De esta forma, el tratamiento actual de la malaria continúa siendo la administración de fármacos antimaláricos, basado fundamentalmente en el empleo de quinoleínas, antifolatos y artemisininas. Debido a la amplia y rápida aparición de resistencias en los parásitos frente a los dos primeros grupos de fármacos, en la actualidad se recomienda el uso de terapias combinadas con artemisininas para frenar el desarrollo de resistencias frente a las mismas (Sadanand, 2011).

Este proceso adaptativo del parásito dificulta enormemente el control de la enfermedad (Greenwood *et al.*, 2008) y ha favorecido el resurgimiento de la malaria en zonas de los trópicos y ciudades donde ya se había erradicado (Jamison, 2006). Además, con frecuencia el tratamiento no se realiza adecuadamente o se retrasa su administración desde la presentación de los síntomas (Smith *et al.*), lo cual puede ser fatal en los casos de malaria severa, que se producen sobre todo en niños. Por otro lado, también se ha acelerado el desarrollo de resistencia a insecticidas por parte de los vectores transmisores del parásito (Greenwood *et al.*, 2008), lo que aumenta aún más las dificultades que existen para el control de la malaria.

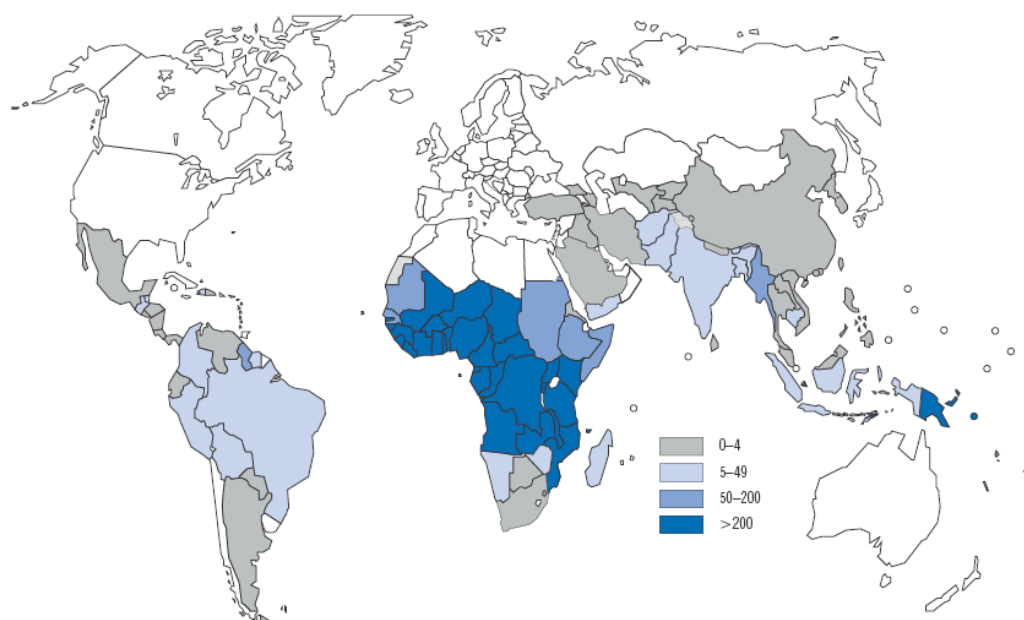


Figura 1.- Distribución global de la malaria: Incidencia de episodios clínicos de malaria a nivel mundial (por 1000 personas) en 2006 (WHO, 2008).

El agente etiológico causante de la malaria en mamíferos, reptiles y pájaros es un protozoo perteneciente al género *Plasmodium* que se transmite mediante vectores artrópodos de distintos géneros de dípteros, como *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* (Hausmann, 2003). Estos parásitos pertenecen al Subphylum Apicomplexa y se caracterizan porque las fases que invaden a las células hospedadoras presentan el denominado complejo apical (un conjunto estructural subcelular de anillos, roptrias y micronemas implicados en la invasión) y una serie de gránulos densos que se vacían en la vacuola parasitófora donde se albergará el parásito (Hausmann, 2003).

Aunque dentro del género *Plasmodium* existen más de cien especies, solamente cinco producen la enfermedad en humanos: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* y *P. knowlesi*. Esta última es la causante de la malaria en monos y ha sido recientemente descrita como la quinta especie responsable de producir casos de infección en humanos en el área del sureste asiático (Figtree *et al.*). Todas estas especies se transmiten al hombre por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* (Hoffman *et al.*, 2002), aunque de forma ocasional se puede transmitir por transfusión sanguínea, transplante de órganos o congénitamente de la madre al feto.

2.2.- EL CICLO DE VIDA DE PLASMODIUM

Los protozoos del género *Plasmodium* presentan un ciclo de vida complejo en el que adoptan distintos fenotipos parasitarios a lo largo de su desarrollo (Figura 2). Para que se complete este ciclo, *Plasmodium* necesita dos hospedadores: el mosquito, hospedador definitivo, en el cual se produce su reproducción sexual, a la par que es el vector de transmisión al mamífero, que actúa de hospedador intermediario y es donde tiene lugar la reproducción asexual del parásito. Esta fase del ciclo es la responsable de las manifestaciones clínicas de la enfermedad conocida como malaria o paludismo (Sleigh, 1979; Warrell, 2002).

En mamíferos, la transmisión de los parásitos comienza por la picadura del mosquito infectado que inocula los esporozoítos (estadio invasivo con forma fusiforme) mayoritariamente en la dermis de su hospedador. Estos esporozoítos entran en el torrente sanguíneo, directamente o mediante la vía linfática. A su paso

por el parénquima hepático cada esporozoíto invade a una célula hepática, donde se forma una vacuola parasitófora que alberga al parásito y lo separa del citoplasma de la célula hospedadora (Prudencio *et al.*, 2006; Sleight, 1979; Warrell, 2002). Allí, éste divide su núcleo miles de veces, formando una nueva forma celular parasitaria, el esquizonte, que contiene hasta 30.000 células hijas en su interior denominadas merozoítos (Good *et al.*, 2005). El hepatocito infectado finalmente se lisa y libera los merosomas que contienen los merozoítos (Prudencio *et al.*, 2006; Sturm *et al.*, 2006).

Esta fase, denominada ciclo exoeritrocítico o esquizogonia hepática, oscila entre 5 y 15 días dependiendo de la especie (Oaks, 1991; Warrell, 2002). En algunas especies, como es el caso de *P. vivax* y *P. ovale*, existen formas, denominadas hipnozoítos, que pueden permanecer latentes en el hígado durante largo tiempo antes de comenzar su desarrollo a nuevos estadios multiplicativos. Este fenómeno puede ocasionar una posterior recaída clínica (Daily & Waldron, 2003; Frevert & Nardin, 2005; Hausmann, 2003; Warrell, 2002).

Una vez fuera del hepatocito, los merosomas se dirigen a los capilares pulmonares, donde en un periodo de 48-72 horas liberarán los merozoítos que contienen en su interior. Estas formas parasitarias invadirán definitivamente los glóbulos rojos del hospedador (Baer *et al.*, 2007), donde comienza una nueva fase, denominada ciclo intraeritrocítico. El proceso de invasión del hematíe es extremadamente rápido (aproximadamente de unos 30 segundos) y transcurre mediante una serie de pasos sucesivos: (i) interacción del parásito con el eritrocito, (ii) reorientación de su extremo apical hacia la membrana del glóbulo rojo, (iii) formación de una unión estrecha entre parásito y eritrocito y (iv) entrada del merozoíto en el hematíe.

Durante el proceso invasivo se forma nuevamente una vacuola parasitófora que aísla a *Plasmodium* del interior de la célula en la que se localiza (Silvie *et al.*, 2008; Warrell, 2002). Una vez en el interior del eritrocito, el merozoíto comienza un proceso de multiplicación durante el cual se diferencia en distintos estadios según su estado nutricional. El proceso se inicia con una forma parasitaria joven, vacuolada, que recibe el nombre de anillo, y que crece hasta ocupar casi por completo el glóbulo rojo, originando así una nueva forma metabólicamente muy

activa, denominada trofozoíto, la cual ingiere el contenido citoplasmático del eritrocito a través del citostoma o microporo. Durante el estadio de trofozoíto se incrementa la maquinaria sintética de proteínas parasitarias que le permiten entrar en la fase de esquizogonia eritrocítica, en la cual los trofozoítos maduros dividen su núcleo originando formas más maduras, los esquizontes que contienen entre 6 y 32 nuevos merozoítos (Sleigh, 1979; Warrell, 2002; Winzeler, 2006).

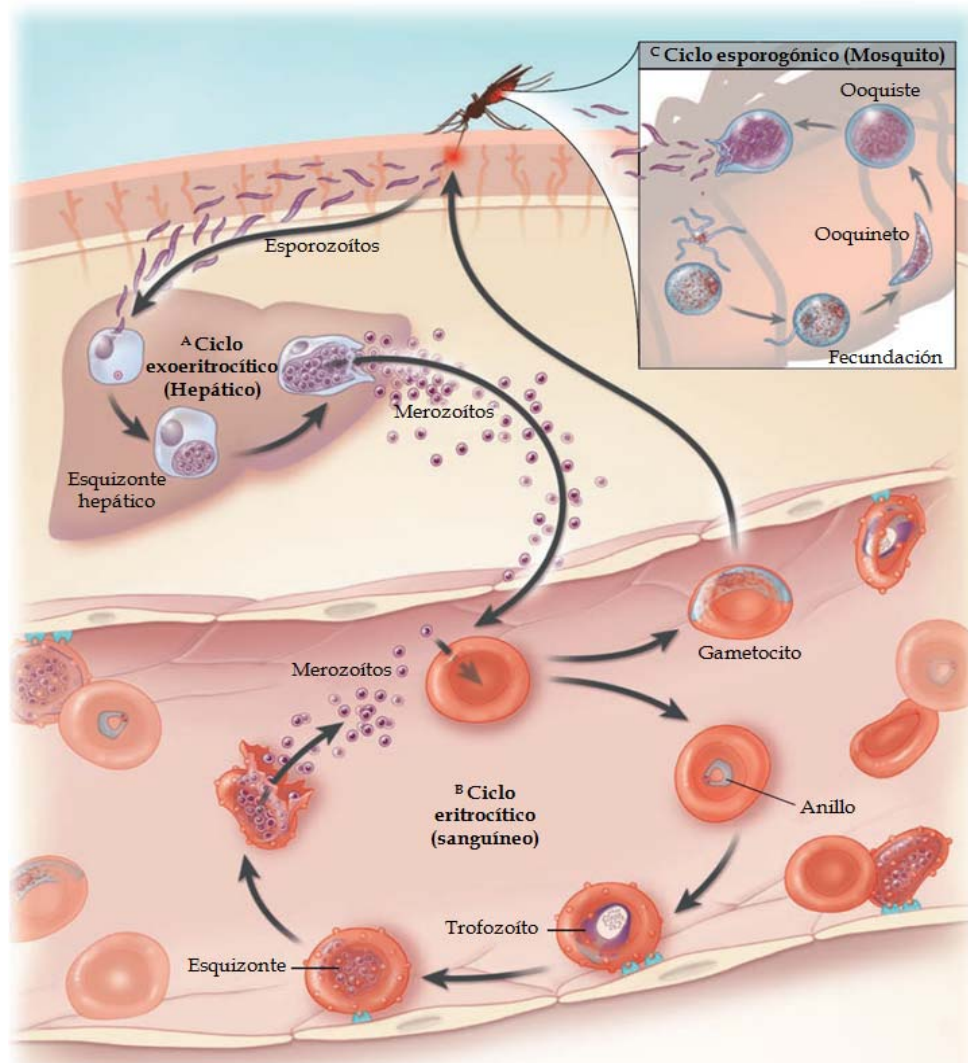


Figura 2.- Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. en el hombre. A.-Ciclo exoeritrocítico. Un mosquito anofelino inocula los esporozoítos que se dirigen al hígado donde invaden las células hepáticas y producen su primera esquizogonia preeritrocítica. B.- Ciclo eritrocítico. La ruptura del esquizonte hepático libera los merozoítos al torrente sanguíneo donde invaden nuevos glóbulos rojos formándose un anillo que se transforma en trofozoíto. Posteriormente madura a esquizonte, cuya ruptura libera de nuevo merozoítos al torrente sanguíneo. Algunos merozoítos que invaden los eritrocitos pueden madurar a gametocitos que son ingeridos por el mosquito. C.-Ciclo esporogónico. Los gametocitos maduran a macrogametos y microgametos flagelados que, tras la fecundación, producen un ooquineto móvil que atraviesa la pared gástrica para formar un ooquiste que liberará miles de esporozoítos infectivos. (Rosenthal, 2008). Debido a que el desarrollo del esporozoíto sólo sucede a temperaturas superiores a 16°C, la malaria se transmite sobre todo en las zonas templadas del planeta (Hausmann, 2003).

La degradación de la hemoglobina, proteína mayoritaria del eritrocito, es una fuente nutricional esencial del parásito. Como resultado de este proceso catabólico se acumulan productos de desecho con carácter tóxico entre los que destaca el grupo hemo en forma de protoporfirina α . El parásito ha desarrollado una estrategia para defenderse de la acción de este metabolito altamente oxidante, así, en su citoplasma, lleva a cabo la polimerización de la hematina -producto de la degradación parcial de la hemoglobina- generando un compuesto inerte: el pigmento malárico o hemozoína, que permanece en la vacuola digestiva del mismo (Frosch *et al.*, 2007; Warrell, 2002), evitando su toxicidad.

La ruptura del eritrocito da lugar a que los merozoítos se liberen al torrente sanguíneo e invadan nuevos glóbulos rojos, donde se cierra y continúa el ciclo intraeritrocítico (Oaks, 1991). Aunque la mayoría de los merozoítos que invaden los eritrocitos desarrollan el ciclo asexual, una pequeña fracción puede diferenciarse en gametocitos, que son formas sexuales e infectivas para el mosquito vector. Así, tras la picadura del mosquito algunos de estos gametocitos serán capaces de iniciar la reproducción sexual en el aparato digestivo del mismo (Hausmann, 2003; Oaks, 1991; Warrell, 2002).

El gametocito femenino abandona el eritrocito y se transforma en un macrogameto sin sufrir ninguna división, mientras que el microgametocito masculino sufre tres divisiones mitóticas y libera microgametos flagelados, que se mueven a través de la sangre ingerida en busca de un macrogameto. El desarrollo de estos gametos se ve favorecido debido a una disminución de la temperatura y a la presencia de ácido xanturénico en el estómago del mosquito. La fecundación, que se produce en el estómago del mosquito, genera un cigoto diploide, que habrá de sufrir un proceso de meiosis. Transcurridas entre 12 y 48 horas, el cigoto se transforma en un ooquinetto que, tras atravesar las paredes del estómago, se localiza en la lámina basal y segrega una cubierta ooquistica.

Este ooquiste crece y experimenta una esporogonia que rinde un gran número de esporozoítos, por lo que a esta fase del ciclo en el interior del mosquito se la conoce como ciclo esporogónico. Cuando el ooquiste madura se va debilitando y desencadena la liberación de los esporozoítos entre la pared quística y la lámina

basal, por lo que la mayoría pasan al hemocele y se dirigen al interior de las glándulas salivales, desde donde se inyectarán a un nuevo hospedador vertebrado a través de una nueva picadura (Hausmann, 2003; Oaks, 1991; Sleigh, 1979; Warrell, 2002).

2.3.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA MALARIA EN EL HOMBRE

Los síntomas clínicos de la enfermedad se producen durante la fase intraeritrocítica del ciclo de *Plasmodium* y suelen manifestarse entre 10 y 35 días después de que el mosquito inyecte el parásito al ser humano. Por lo general, los primeros signos son fiebre leve e intermitente, dolor de cabeza y muscular y escalofríos acompañados con una sensación de malestar general. En otras ocasiones la malaria comienza su curso con escalofríos y temblores seguidos de fiebre más alta, dolor abdominal y tos, los cuales duran entre 2 y 3 días y con frecuencia se confunden con la sintomatología de la gripe común.

Tras una semana de evolución infecciosa aparece el patrón clásico de fiebre paroxística periódica (a modo de ataques periódicos), momento en el que se sincroniza la esquizogonia hemática (López-Vélez, 2002). En el hombre, la duración del ciclo intraeritrocítico asexual varía dependiendo de la especie infectiva: 48-50 horas en *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum* y 72 horas en *P. malariae*, lo que resulta en la aparición de un patrón diferente de fiebres tercianas o cuartanas según los distintos tipos de malaria humana (Hausmann, 2003; Warrell, 2002). Estos ataques febriles periódicos se producen cuando los fragmentos y detritus celulares que resultan de la digestión celular del parásito se liberan a la circulación sanguínea durante la lisis de los eritrocitos (Figura 3) ya que inducen la liberación de citoquinas por parte del hospedador (Buffet *et al.*; Schumann, 2007). Los síntomas siguientes y los patrones que continúan caracterizando la enfermedad varían, para cada tipo de paludismo, en función de la especie infectiva de *Plasmodium*, la carga parasitaria y el estado inmune del paciente. De este modo, la sintomatología difiere desde la manifestación única de cuadros febriles leves (malaria no complicada) hasta la aparición de una malaria severa, que puede llegar a ser letal (Miller *et al.*, 2002).

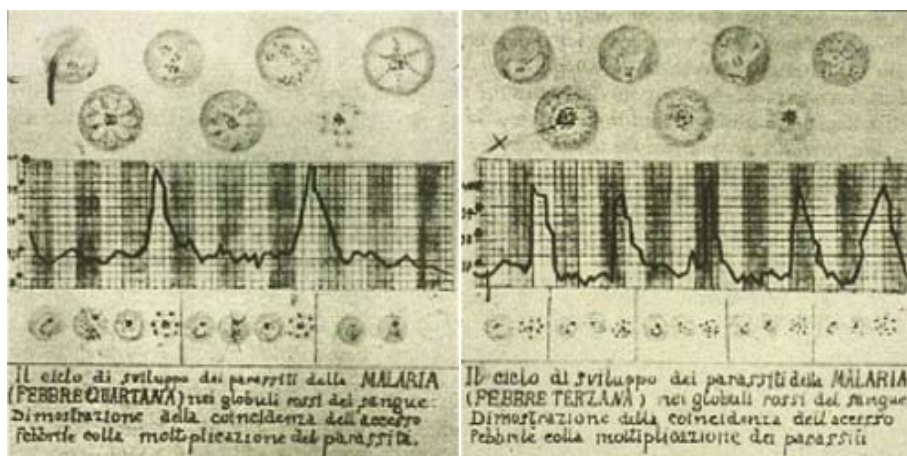


Figura 3.-Relación entre los picos de fiebre del hospedador y el ciclo eritrocítico del parásito. Dibujo de Camilo Golgi que muestra la relación de las fiebres cuartanas (izquierda) y las tercianas (derecha) con el desarrollo del ciclo del parásito en los eritrocitos. El texto enfatiza la coincidencia entre el pico de fiebre con la multiplicación de los parásitos (Bentivoglio *et al.*, 2010).

La malaria no complicada en el hombre es típica de *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. En algunas ocasiones, la infección crónica por *P. malariae* puede producir una glomerulopatía y la malaria por *P. vivax* puede ocasionar fiebre aguda y anemia (Schofield & Grau, 2005). Sin embargo, normalmente, y si un individuo no recibe tratamiento, los síntomas del paludismo causado por cualquiera de estas tres especies remiten espontáneamente en 10 a 30 días, pero pueden recurrir con intervalos variables.

La mayoría de los casos de malaria severa y de las muertes se producen debido al paludismo ocasionado por *Plasmodium falciparum* (Schofield & Grau, 2005), que es la especie responsable de la forma más grave de malaria humana (Baird, 2005). La malaria grave es un trastorno multisistémico que afecta a varios tejidos y órganos, aunque sus manifestaciones clínicas más marcadas implican generalmente un solo órgano, como es el caso del cerebro en la malaria cerebral (Miller *et al.*, 2002). Ésta es una de las complicaciones más letales de la enfermedad que cursa con diversas alteraciones neurológicas y principalmente afecta a niños, mujeres embarazadas y turistas que visitan zonas de alto riesgo. Además de estos daños neurológicos, *Plasmodium falciparum* puede producir otras complicaciones como anemia severa, insuficiencia respiratoria, edema pulmonar, colapso circulatorio, acidosis con hiperlactacidemia, fallo renal, ictericia y malaria placentaria (López-Vélez, 2002; Schofield & Grau, 2005) (Figura 4).

La anemia severa se produce cuando hay una destrucción masiva de los eritrocitos infectados generados en cada invasión (Schofield & Grau, 2005). En algunos de estos casos se produce la fiebre hemoglobinúrica, donde la rotura de un gran número de glóbulos rojos libera gran cantidad de hemoglobina en el flujo sanguíneo, que luego es excretada con la orina y provoca la aparición de un color oscuro en la misma. Este tipo de estado febril ocurre casi exclusivamente en los enfermos con malaria crónica por *Plasmodium falciparum*, especialmente aquellos que han sido tratados con quinina (Bruneel *et al.*, 2002).

La gravedad de los síntomas de la enfermedad está determinada por varios factores asociados al hospedador: edad, sistema inmune, coinfecciones con otros organismos, estado nutricional, sexo y frecuencia de transmisión (Idro *et al.*, 2005; Schofield & Grau, 2005; van der Heyde *et al.*, 2006). También están implicados una serie de procesos relacionados con el parásito como son la liberación de productos y toxinas que originan y modulan los procesos patogénicos. Entre ellos, y de forma significativa, la formación de hemozoína (Schofield & Grau, 2005), que además de participar en el desarrollo de los procesos febriles del hospedador (Schumann, 2007), debilita su respuesta inmune al inhibir la interacción entre células dendríticas y células T (Millington *et al.*, 2007).

Otros factores relacionados con el parásito que aparecen implicados en la severidad de la malaria son su velocidad de multiplicación en los glóbulos rojos infectados, la destrucción tanto de eritrocitos infectados como no infectados, la marcada reducción de la deformabilidad de los glóbulos rojos no infectados y la unión de los eritrocitos parasitados al endotelio vascular (citoadherencia) o a glóbulos rojos no infectados (formación de rosetas) (Chen *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002; Schofield & Grau, 2005). Estas uniones pueden producir la acumulación de hematíes en la microvasculatura capilar y bloquear el flujo sanguíneo, limitando así la suplementación de oxígeno local (Chen *et al.*, 2000). De esta forma, los parásitos pueden localizarse en varios órganos incluyendo el corazón, los pulmones, el cerebro, el hígado, los riñones, tejidos subcutáneos y la placenta. La acumulación de parásitos en cerebro y placenta juega un papel importante en el desencadenamiento de la malaria cerebral y placentaria, respectivamente (Figura 4) (Miller *et al.*, 2002).

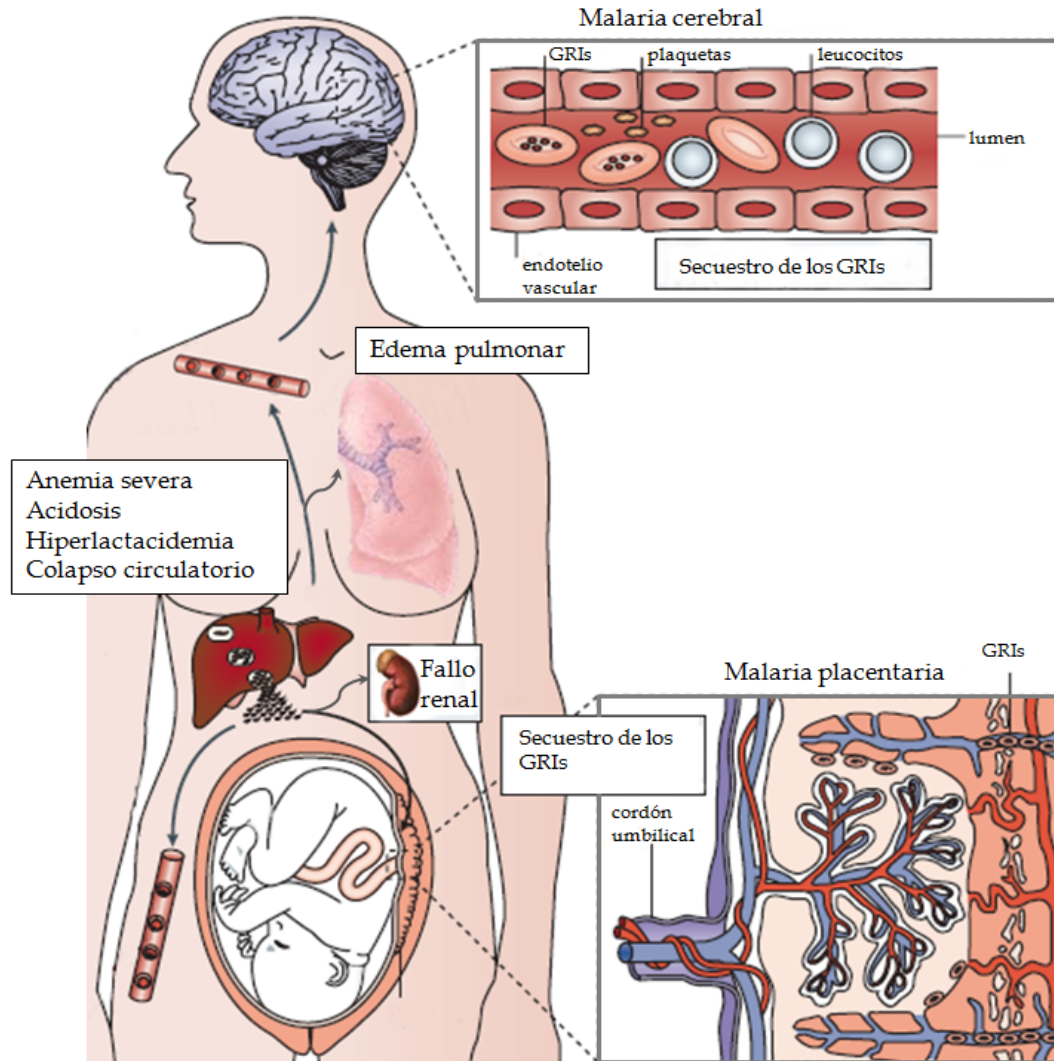


Figura 4.-Principales complicaciones producidas por el ciclo eritrocítico de *P. falciparum* en el hombre. Durante el ciclo eritrocítico, *P. falciparum* puede secuestrarse en los capilares del cerebro y de la placenta. Además, la masiva destrucción de los glóbulos rojos puede producir anemia severa. Otras complicaciones incluyen la acidosis metabólica, la hiperlactacidemia, el colapso circulatorio, el fallo renal y el edema pulmonar (López-Vélez, 2002; Schofield & Grau, 2005).GRIs: glóbulos rojos infectados.

Por último, destacar que en el progreso de la malaria, la respuesta inmune del hospedador también juega un papel muy importante, a través de la producción sistémica o local de citoquinas y quimioquinas y la activación, secuestro e infiltración de las células inflamatorias (Chen *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002; Schofield & Grau, 2005; van der Heyde *et al.*, 2006).

2.4.- MALARIA CEREBRAL

La malaria cerebral es una de las encefalopatías más comunes que existen a nivel mundial y la enfermedad parasitaria más importante del sistema nervioso central (Bentivoglio *et al.*, 2010). Se trata de la mayor complicación de la infección producida por *Plasmodium falciparum*, responsable de un 80% de todas las muertes causadas por malaria, sobre todo en los que afectan a niños de dos a seis años del África subsahariana y adultos del sudeste asiático, aunque los rasgos clínicos en niños y en adultos son diferentes (Armah *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2006; Idro *et al.*, 2010b; Lou *et al.*, 2001). La enfermedad se desarrolla preferentemente en aquellos pacientes que no han adquirido un grado suficiente de inmunidad protectora (Gitau & Newton, 2005).

Aunque la malaria cerebral puede ser fatal en un 15-30% de los casos que la padecen, es potencialmente reversible (Bentivoglio *et al.*, 2010). Generalmente, los pacientes que sobreviven a esta infección sufren una recuperación completa, restableciendo la consciencia tras 2-3 días de tratamiento antimalárico, aunque se ha observado que en muchos de ellos persisten secuelas neurológicas a largo plazo, particularmente en el caso de niños africanos (Bentivoglio *et al.*, 2010; Idro *et al.*, 2005; Idro *et al.*, 2010a; Idro *et al.*, 2010b).

2.4.1.- Clínica y secuelas

La malaria cerebral cursa con síntomas que varían desde la confusión y aletargamiento hasta la obnubilación y el coma profundo. Esta variabilidad individual refleja que, a pesar de utilizar criterios clínicos estandarizados para su diagnóstico, la malaria cerebral es un síndrome clínico heterogéneo (Medana & Turner, 2006).

Las manifestaciones neurológicas más características asociadas a la malaria cerebral incluyen irritabilidad, agitación psicomotora y signos de disfunción del tallo cerebral como son cambios en la postura, anormalidades motoras del tono y de los reflejos, rigidez, patrones respiratorios afectados, cambios de la pupila y de los movimientos oculares. Así, en los pacientes febriles e inconscientes es común

encontrar mirada divergente, pupilas reactivas, hemorragias retinianas y reflejos oculocefálicos (Combes *et al.*, 2010; Idro *et al.*, 2005; Idro *et al.*, 2010b; Lackner *et al.*, 2006; Mishra & Newton, 2009; Newton *et al.*, 2000). También son síntomas particulares la hiperventilación, fallo cardíaco y respiratorio, convulsiones, pérdida de la consciencia y coma (Combes *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2000). Otro rasgo de la malaria cerebral es la aparición de acidosis metabólica causada por la insuficiencia renal aguda, por la acidosis láctica o por ambas. Por último existen otras alteraciones como son hipoglucemia, anemia, ictericia, acidosis respiratoria y edema pulmonar, que también están presentes en individuos que sufren malaria cerebral (Mishra & Newton, 2009; Zapata-Zapata & Blair-Trujillo, 2003).

Por otra parte, también se ha visto que la sintomatología clínica de la malaria cerebral cursa con diferencias entre adultos y niños. Mientras que los niños desarrollan el estado de coma rápidamente tras la aparición de las primeras convulsiones, en adultos la adquisición del estado comatoso es más gradual y suele estar precedido de desorientación, delirio y agitación. Por otro lado, la presencia de convulsiones, estados epilépticos, alteraciones de la retina, fallos del tallo cerebral, presión intracraneal elevada, inflamación cerebral, deshidratación, dificultad respiratoria, cambios electrolíticos y complicaciones como anemia severa, acidosis metabólica, hiperlactemia, hiponatremia e hipoglucemia son más frecuente en niños.

En adultos, la malaria cerebral suele estar acompañada de hemorragias, ictericia, edema pulmonar, fallo renal, acidosis láctica y hemoglobinuria (Idro *et al.*, 2005; Idro *et al.*, 2010a; Idro *et al.*, 2010b; Newton *et al.*, 2000; Patankar *et al.*, 2002; Zapata-Zapata & Blair-Trujillo, 2003).

Aunque, en una parte importante de los casos que la padecen, esta patología produce la muerte, especialmente si no se trata a tiempo, existen individuos que se recuperan completamente de la infección. No obstante, una proporción significativa de supervivientes (más del 10%) presentan complicaciones neurológicas permanentes (Idro *et al.*, 2010a; Idro *et al.*, 2010b). Los daños cognitivos a largo plazo son frecuentes en niños y se han reportado en uno de cada cuatro casos infantiles que sobreviven a la malaria cerebral (John *et al.*, 2008). De hecho, esta infección podría ser la mayor causa de daños cognitivos en niños del África subsahariana

(Boivin *et al.*, 2007). En adultos, las deficiencias se presentan en un menor número de casos (menos del 5%) y son menos graves (Gitau & Newton, 2005), estando asociadas principalmente a cambios de personalidad, depresión y ansiedad (Idro *et al.*, 2005). Los daños neurológicos que aparecen en niños incluyen déficits en las áreas de la memoria, atención y desórdenes del lenguaje, problemas de comportamiento, daños en la vista, audición y tacto, pero también epilepsia y disfunciones motoras, como ataxia y parálisis (Bangirana *et al.*, 2006; Boivin *et al.*, 2007; Holding & Snow, 2001; Idro *et al.*, 2010a; Idro *et al.*, 2010b; John *et al.*, 2008).

Los niños que han sufrido coma profundo desarrollan los déficits cognitivos más severos (Bangirana *et al.*, 2006). En algunos de los casos estas secuelas pueden llegar a ser fatales en unos pocos meses tras superar la enfermedad, incluyendo quadriparesis y estados vegetativos (Carter *et al.*, 2005; John *et al.*, 2008). Otras veces pueden ser transitorias en un corto periodo de tiempo (por ejemplo, la ataxia), mejorar rápidamente con el transcurso de los meses (por ejemplo, la ceguera cortical) o pueden persistir durante períodos de tiempo más prolongados (por ejemplo, la hemiparesis) (Mishra & Newton, 2009). Los daños neurológicos pueden presentarse ya durante la fase de recuperación, pero también pueden desarrollarse más tarde (John *et al.*, 2008). Muchas veces las secuelas menos graves van haciéndose más aparentes según el niño avanza en edad y, de hecho, el daño cognitivo parece agravarse en el tiempo (Carter *et al.*, 2005; John *et al.*, 2008). Estos niños sufren dificultades en un entorno educacional sin un soporte específico, como ocurre en las zonas rurales de África. Además, se ha visto que presentan reducidas oportunidades futuras de encontrar un empleo o formar una familia (Carter *et al.*, 2005).

Es importante considerar que la mayoría de los pacientes con malaria cerebral, al ser niños menores de cinco años, se encuentran en proceso de maduración de este órgano. Por ello, alteraciones como las producidas en el lenguaje, función que puede estar ya establecida en el momento de la adquisición de la enfermedad, podrían atribuirse a lesiones ocurridas en localizaciones cerebrales específicas, mientras que otras disfunciones cognitivas asociadas con aspectos que todavía estaban por aprender, podrían ser consecuencia de un desarrollo subóptimo de la maduración del órgano (Holding & Snow, 2001). La observación clínica de

patrones distintos en las secuelas producidas, podría ser debida a la extensión del daño o a una distinta afectación en zonas específicas del cerebro (Idro *et al.*, 2010a). La Figura 5 muestra la localización de diversas regiones cerebrales en un corte sagital de cerebro humano.

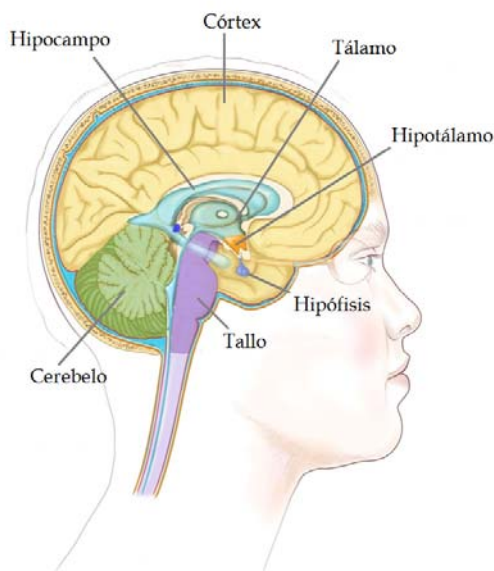


Figura 5.- Corte medial-sagital de un encéfalo humano.

De hecho, exámenes histológicos realizados, tanto de muestras de cerebro post-mortem de pacientes como en cerebros de ratones afectados por malaria cerebral, han revelado que la afectación de esta enfermedad difiere según las zonas del cerebro. La Tabla 1 recoge las principales funciones de diversas áreas que podrían estar implicadas en las alteraciones de la malaria cerebral, así como las lesiones observadas durante el desarrollo de la misma.

Es importante tener en cuenta que todas estas regiones, a excepción de unas pequeñas estructuras especializadas localizadas en el tallo, hipófisis y otras zonas del cerebro, están protegidas por la barrera hematoencefálica (Kandel *et al.*, 2001), la cual separa la sangre del fluido intersticial del sistema nervioso central (Abbott *et al.*, 2006). La barrera hematoencefálica está formada por células endoteliales adheridas mediante uniones estrechas, junto con la membrana basal y células perivasculares como pericitos, astrocitos, microglía y monocitos perivasculares, que limitan la difusión pasiva a través de las paredes vasculares (Abbott *et al.*, 2006; Kandel *et al.*,

2001; Medana & Turner, 2006; Zapata-Zapata & Blair-Trujillo, 2003). Se ha visto que la estructura de la barrera hematoencefálica también está alterada durante el progreso de la enfermedad (Medana & Turner, 2006).

Tabla 1.-Regiones cerebrales posiblemente implicadas en el daño durante la malaria cerebral

REGIÓN	FUNCIÓN ^a	ALTERACIONES EN LA MALARIA CEREBRAL ^b
Córtex	Pensamiento, memoria, aprendizaje, lenguaje y atención	Lesiones con hemorragias o infartos no hemorrágicos
Hipocampo	Memoria, navegación espacial	Daño en niños y pacientes recuperados que podría estar relacionado con trastornos en la memoria y convulsiones
Bulbo olfativo	Procesamiento de olores	Alteraciones histopatológicas y hemorragias
Tálamo	Coordinación de las señales sensoriales y motoras	Cambios isquémicos e hipoatenuación
Hipotálamo	Control de los reflejos y homeostasis	No se ha relacionado de forma específica. Alteraciones en la hipófisis, con la que mantiene conexiones
Tallo	Respiración, presión arterial, equilibrio y postura	Inflamación y alteraciones en niños
Cerebelo	Movimientos complejos, postura, orientación espacial y algunas funciones cognitivas	Hemorragias, infartos no hemorrágicos, cambios isquémicos, desmielinización. Hipoatenuación relacionada con peor pronóstico

^a Tomado y adaptado de (Cunha *et al.*, 2010; Guyton, 1994; Purves *et al.*, 2001; Randall, 1999; Rhoades, 2003; Tórtora, 2002).

^b Alteraciones descritas en pacientes o modelos experimentales murinos de malaria cerebral. Tomado y adaptado de (Grote *et al.*, 1997; Idro *et al.*, 2005; Lackner *et al.*, 2006; Patankar *et al.*, 2002; Penet *et al.*, 2005; Wiese *et al.*, 2006).

2.4.2.- Patogénesis de la malaria cerebral

Aunque la patogénesis de la malaria cerebral no se conoce completamente, la presencia de parásitos en el cerebro y la respuesta del sistema inmune del hospedador adquieren especial relevancia. Muchos autores sugieren que en esta forma complicada de la enfermedad existe una combinación de ambos mecanismos, así como la influencia de otros concomitantes (Combes *et al.*, 2006; de Souza & Riley, 2002; van der Heyde *et al.*, 2006), entre los que se incluyen alteraciones en los sistemas de neuroprotección (Delahaye *et al.*, 2007) y el estrés oxidativo (Pino *et al.*, 2005; Pino *et al.*, 2003a; Postma *et al.*, 1996; Wiese *et al.*, 2006).

2.4.2.1.- Secuestro de glóbulos rojos infectados

El secuestro de formas maduras del parásito en la microvasculatura cerebral se ha postulado como una de las causas principales de esta forma severa de malaria (White & Ho, 1992). Estos datos se evidencian por la ausencia de trofozoítos maduros y esquizontes en los frotis de sangre periférica realizados en pacientes con malaria causada por *P.faciparum* (Miller *et al.*, 2002) lo cual sugiere su acúmulo en otros órganos. Además, los estudios histopatológicos llevados a cabo en muestras obtenidas a partir de biopsias de pacientes con malaria cerebral (adultos o niños), ponen de manifiesto la presencia de los glóbulos rojos infectados por el parásito en la microvasculatura del cerebro (Idro *et al.*, 2005). Aunque son diversos los estudios que indican que hay un mayor secuestro vascular en los casos de malaria con complicaciones cerebrales que en pacientes con malaria no cerebral (Pongponratn *et al.*, 2003), existen también algunos que no observan tales diferencias (Franke-Fayard *et al.*, 2005; Medana *et al.*, 2001), por lo que el papel del secuestro eritrocitario es aun materia de debate (Pongponratn *et al.*, 2003).

Ya en 1887 Marchiafava y Celli proporcionaban la primera ilustración de la presencia de eritrocitos parasitados en los vasos sanguíneos del cerebro (Marchiafava & Celli, 1887) (Figura 6) y en 1894, se formulaba la primera hipótesis de secuestro de los glóbulos rojos parasitados, en la que se afirmaba que los eritrocitos infectados se unen a las vénulas postcapilares (Marchiafava & Bignami, 1894).

Este fenómeno provocaría así una obstrucción considerable en el flujo sanguíneo, disminuyendo la perfusión de los tejidos y la eliminación de productos de desecho (van der Heyde *et al.*, 2006), lo que ocasionaría la aparición de hemorragias (Idro *et al.*, 2005; Schofield & Grau, 2005). Además, podría producir efectos adversos en el endotelio, disrupción de la barrera hematoencefálica, daño neuronal, diversas alteraciones metabólicas y liberación de mediadores inflamatorios deletéreos (Franke-Fayard *et al.*, 2010; Idro *et al.*, 2005; Medana & Turner, 2006; Medana & Turner, 2007; Pino *et al.*, 2005; Rowe *et al.*, 2009). También se ha visto que la obstrucción microvascular está asociada al riesgo de padecer secuelas neurológicas tras sufrir malaria cerebral (Holding & Snow, 2001).

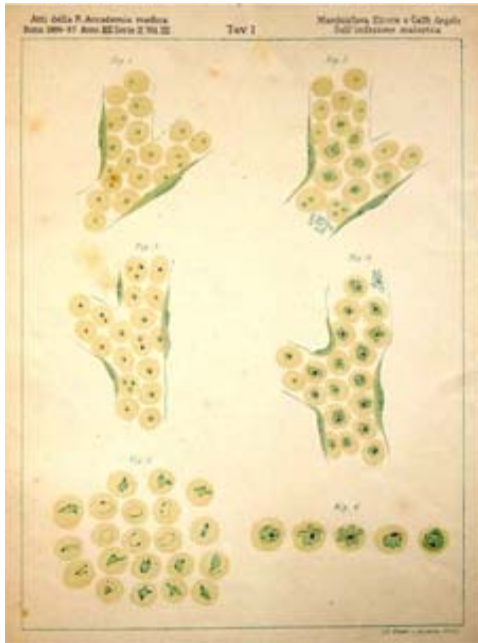


Figura 6.- Secuestro de glóbulos rojos en los capilares sanguíneos. Dibujo del estudio pionero de Marchiafava y Celli en 1887 mostrando parásitos causantes de la malaria en los capilares del cerebro en casos de malaria. Se pueden observar imágenes de replicación del parásito, ilustraciones del pigmento malárico y alteraciones de los eritrocitos (Marchiafava & Celli, 1887).

La razón última por la que los parásitos se secuestran en los capilares sanguíneos se desconoce por el momento, aunque se cree que esta circunstancia proporcionaría a los parásitos un medio más adecuado para su desarrollo debido al relativo grado de hipoxia a la vez que prevendría su aclaramiento y eliminación en el bazo (Brian de Souza *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2000; Newton *et al.*, 2000). Tampoco se conoce si la aparición de los parásitos en el cerebro tiene lugar antes o después de la inducción del coma (Clark *et al.*, 2006), aunque la hipótesis más aceptada es que su presencia allí sea una de las causas que lo desencadenen (Chen *et al.*, 2000). Sin embargo, aunque el secuestro parasitario parece necesario para que se produzca la complicación cerebral, no resulta ser suficiente para su desarrollo (Combes *et al.*, 2006; Schofield & Grau, 2005).

Actualmente existen varias hipótesis complementarias que tratan de explicar cómo se produce el secuestro parasitario en los tejidos endoteliales. Se ha visto que las propiedades de los glóbulos rojos infectados cambian, y especialmente su membrana que se hace menos flexible, lo que dificulta su paso a través de la microvasculatura y produce la obstrucción de los capilares (van der Heyde *et al.*, 2006). También se ha visto que los eritrocitos infectados tienen capacidad de autoaglutinarse (Idro *et al.*, 2005; Idro *et al.*, 2010b; Mishra & Newton, 2009) y que proteínas adhesivas del parásito exportadas a la membrana de la célula hospedadora permiten que los eritrocitos parasitados interaccionen con múltiples

receptores humanos (Schofield & Grau, 2005). Pero además, los eritrocitos no parasitados también pueden perder flexibilidad debido al estrés oxidativo producido durante la infección (van der Heyde *et al.*, 2006).

Distintas variantes de la proteína PfEMP-1 (del inglés, “erythrocyte membrane protein 1” de *P.falciparum*), codificada por la familia de genes *var* del parásito y asociada a diferentes fenotipos adhesivos (Idro *et al.*, 2005), son responsables de algunas propiedades de adherencia de los glóbulos rojos infectados. Aunque cada hematíe parasitado parece expresar sólo una variante de esta proteína al mismo tiempo, en cada nueva reproducción asexual se puede producir un reordenamiento en el gen responsable de su síntesis, dando lugar a un nuevo fenotipo adhesivo diferente. Además, existen otras variantes antigénicas derivadas del parásito expuestas en la membrana de los eritrocitos infectados que potencialmente podrían estar implicadas en la adhesión, como las proteínas RIFINs y STREVOs, aunque, por el momento se desconocen sus funciones (Chakravorty *et al.*, 2008; Rowe *et al.*, 2009).

Estas moléculas cambian significativamente la naturaleza de los glóbulos rojos. El cambio ultraestructural más prominente es la aparición de unas protrusiones denominadas “knobs”, compuestas por varios polipéptidos, entre ellos la proteína PfEMP1 (Fujioka & Aikawa, 1996; Luse & Miller, 1971). Estos “knobs” parecen ser sitios donde los eritrocitos infectados se unen a otras superficies celulares, como otros glóbulos rojos no infectados y células endoteliales (Aikawa, 1988; Aley *et al.*, 1984; MacPherson *et al.*, 1985). Sin embargo, la presencia de “knobs” no es absolutamente esencial para el secuestro de hematíes infectados. Células rojas que no presentan “knobs” pueden ser también muy adhesivas y expresar PfEMP-1 así como otras proteínas del parásito que se exportan a su superficie, mediando su unión a diversos receptores (Chen *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 1998).

Hasta la fecha se han descrito tres mecanismos de adhesión de glóbulos rojos infectados (Figura 7): (i) agregación mediada por plaquetas, (ii) adhesión a eritrocitos no infectados, con la consecuente formación de rosetas y (iii) citoadherencia a las células endoteliales (Pain *et al.*, 2001; Udeinya *et al.*, 1981;

Udomsangpetch *et al.*, 1989). Sin embargo, todavía no se ha resuelto qué proporción de parásitos acumulados en el cerebro está asociada con la inducción de las moléculas de adhesión mediante interacciones clásicas ligando-receptor y qué proporción está asociada a la deposición no específica de plaquetas activadas (Schofield & Grau, 2005).

(i) Adhesión mediada por plaquetas: las moléculas de adhesión presentes en los glóbulos rojos infectados pueden interaccionar con receptores plaquetarios que servirían como "puentes" entre los distintos eritrocitos infectados, favoreciendo así su agregación. Se han descrito tres receptores implicados en estas uniones: CD36, el receptor globular C1q y la P-selectina (del inglés, "platelet selectin"). Este fenómeno de agregación inducido por plaquetas se ha observado *in vitro*, pero podría contribuir a la obstrucción microvascular que aparece *in vivo*. Además, las plaquetas también podrían favorecer la citoadherencia actuando como nuevos "puentes" entre las células endoteliales y los glóbulos rojos infectados, contribuyendo al secuestro incluso en lechos endoteliales que no expresen los receptores adecuados para la interacción directa con los hematíes infectados (Rowe *et al.*, 2009).

(ii) Formación de rosetas: los glóbulos rojos infectados también pueden unirse a otros no infectados formando agregados denominados rosetas, lo que causaría una mayor resistencia al flujo microvascular (Pongponratn *et al.*, 2003). La capacidad de formación de rosetas difiere según los aislados clínicos de *Plasmodium* y se asocia frecuentemente con la gravedad de la malaria en pacientes africanos (Pain *et al.*, 2001). Así, se ha visto que la formación de rosetas en sangre infectada con parásitos procedentes de pacientes afectados por malaria cerebral es mucho mayor que aquellos aislados obtenidos a partir de casos de malaria no complicada (Carlson *et al.*, 1990). Además, la agregación de eritrocitos en rosetas está íntimamente relacionada con el fenómeno de citoadherencia, ya que algunos de los receptores implicados en la formación de las mismas también se expresan en las células endoteliales pudiendo presentar un papel dual en ambos mecanismos (Vogt *et al.*, 2003). Por el momento, se han identificado cuatro tipos de receptores en célula roja con capacidad de unirse a ligandos del parásito: el receptor del complemento 1, glicosaminoglicanos de heparán-sulfato, el receptor CD36 y los grupos antígenicos sanguíneos A y B (Handunnetti *et al.*, 1992).

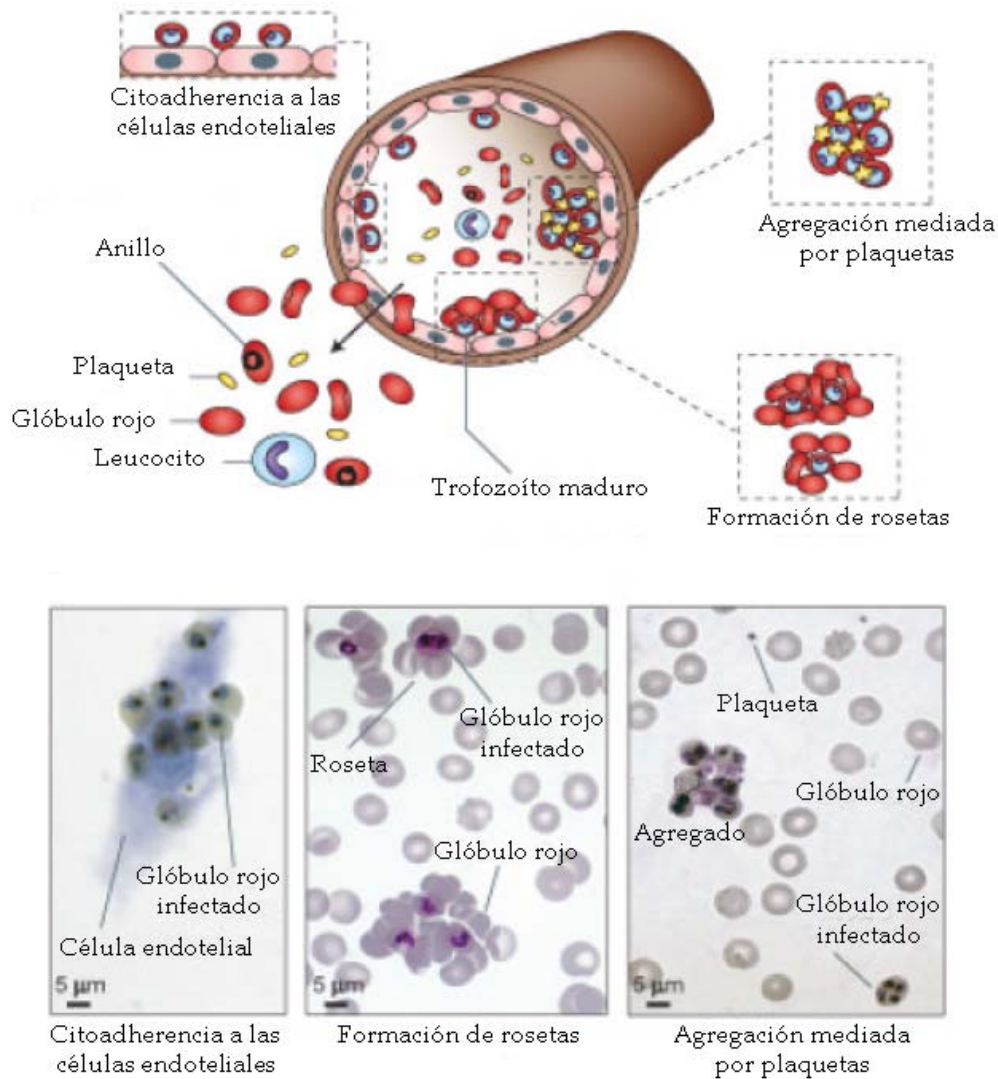


Figura 7.- Mecanismos implicados en el secuestro de glóbulos rojos parasitados (Rowe *et al.*, 2009).

(iii) Citoadherencia a las células endoteliales: se ha visto que los glóbulos rojos infectados tienen el potencial de unirse a una gran diversidad de receptores del endotelio, como el CD36. Sin embargo, el papel que juega este receptor en la patogénesis de la malaria severa presenta controversia (Serghides *et al.*, 2003) y se considera que es difícil que medie en el secuestro a nivel cerebral ya que sus niveles de expresión son bajos en este órgano y no se induce durante la infección malárica (Brian de Souza *et al.*, 2009).

La molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, del inglés, “intercellular adhesion molecule-1”) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresa en células endoteliales y leucocitos y se ha propuesto como principal

mediadora del secuestro de eritrocitos parasitados en el cerebro del hospedador (Armah *et al.*, 2005; Brian de Souza *et al.*, 2009; Rowe *et al.*, 2009). Estudios inmunohistoquímicos han revelado que los glóbulos rojos parasitados y los receptores ICAM-1 colocalizan en los cerebros de pacientes que mueren de malaria cerebral y se ha demostrado su inducción en este órgano durante el desarrollo de esta patología (Idro *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 1994). Además, aislados clínicos obtenidos de pacientes que sufren malaria cerebral presentan una mayor preferencia por la adhesión *in vitro* a la molécula ICAM-1 (Chakravorty *et al.*, 2008), a la par que hay polimorfismos en el gen que codifica este receptor capaces de modificar su capacidad de unir eritrocitos infectados, y que se asocian con la susceptibilidad a la malaria cerebral sufrida por niños de Kenia (Fernandez-Reyes *et al.*, 1997). Por otro lado, modelos murinos de malaria experimental han puesto de manifiesto el importante papel de ICAM-1 en el desarrollo de esta patología, ya que ratones deficientes en dicho receptor no desarrollan esta complicación cerebral (Brian de Souza *et al.*, 2009; Combes *et al.*, 2010). Sin embargo, hay otros estudios que proponen que esta molécula de adhesión únicamente interviene en la primera interacción con los glóbulos rojos infectados y que su unión estable ocurre en sinergismo con otros receptores, es más, algunos autores no observan diferencias en cuanto a la unión glóbulo rojo infectado-receptor entre pacientes con malaria leve y severa (Craig *et al.*, 1997; McCormick *et al.*, 1997; Newbold *et al.*, 1997).

Además de ICAM-1, se han propuesto otras moléculas receptoras como mediadoras del secuestro de eritrocitos parasitados en el cerebro. Durante la patogénesis de la malaria cerebral se ha visto la inducción de receptores como la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1, del inglés “vascular cell adhesion molecule-1”), la E-selectina (del inglés, “endothelial selectin”) y la P-selectina (Armah *et al.*, 2005; Brian de Souza *et al.*, 2009; Pongponratn *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 1994).

La proteína de adhesión VCAM-1 es otro miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en el endotelio activado por citoquinas. Se ha demostrado la unión de células parasitadas a este receptor, aunque en aislados clínicos africanos es débil y no parece estar asociada a la aparición de malaria severa (Newbold *et al.*, 1997).

La molécula de adhesión P-selectina es una glicoproteína que se expresa en plaquetas activadas y en células endoteliales, siendo fundamental para el tráfico de leucocitos. Por un lado, se ha visto su capacidad de adhesión en aislados clínicos procedentes de Asia (Ho *et al.*, 1998) y además parece ser una molécula fundamental para el desarrollo de la malaria cerebral ya que ratones deficientes en ella están protegidos (Weiser *et al.*, 2007).

La proteína E-selectina es otra glicoproteína que se expresa en células endoteliales en aquellos lugares donde aparece inflamación. Su papel en el proceso de citoadherencia también presenta controversia, ya que, mientras algunos trabajos demuestran que parásitos procedentes de cepas de laboratorio se adhieren a esta molécula, muchos aislados clínicos no producen esta unión o se unen débilmente (Newbold *et al.*, 1997; Ockenhouse *et al.*, 1992; Sherman *et al.*, 2003).

Aunque todavía no existe un consenso en el papel que juegan los cuatro receptores anteriormente descritos en la patogénesis de la malaria cerebral (Brian de Souza *et al.*, 2009), estas moléculas parecen ayudar a los glóbulos rojos a adherirse a los vasos sanguíneos (Armah *et al.*, 2005; Pino *et al.*, 2005). El fracaso en encontrar un único receptor crítico, que medie el secuestro de los eritrocitos infectados en el cerebro durante la malaria cerebral, puede indicar que existen uniones redundantes por el parásito a distintos receptores. Esto sustenta la hipótesis que apoya que el fenómeno de citoadherencia implica múltiples pasos (Brian de Souza *et al.*, 2009).

Recientemente se ha visto que la molécula de adhesión neural (NCAM, del inglés, "neural cell adhesion molecule") tiene capacidad de adhesión *in vitro* a los glóbulos rojos infectados (Pouvelle *et al.*, 2007). Por tanto, este receptor localizado en neuronas, glía, astrocitos y células endoteliales microvasculares (Gingras *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 2007) podría también estar implicado en el fenómeno de citoadherencia. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen estudios *in vivo* de su posible implicación en la malaria cerebral.

2.4.2.2.-Respuesta inmune del hospedador: neuroinflamación

La hipótesis inflamatoria, propuesta por primera vez por Maegraith en 1948, defiende que en la malaria complicada, el daño multiorgánico y la muerte se producen por una respuesta inflamatoria sistémica del hospedador (Maegraith, 1948). Años después se postuló la hipótesis de que la elevada producción de citoquinas pro-inflamatorias era la responsable del coma (Clark *et al.*, 1992b). Otros estudios más recientes ponen de manifiesto la relevancia de sucesos inflamatorios intravasculares como mediadores esenciales de la patología (Bentivoglio *et al.*, 2010). Sin embargo, la inflamación por sí sola tampoco podría explicar todo el proceso patogénico observado (van der Heyde *et al.*, 2006).

El concepto de que una respuesta inmune proinflamatoria excesiva predispone hacia el desarrollo de la malaria cerebral es consistente con la idea de que la susceptibilidad a la misma en las zonas endémicas de malaria está ciertamente relacionada con la edad. Así, los niños menores de 6 meses que aun tienen que adquirir una respuesta inmune específica son relativamente resistentes frente esta patología; sin embargo, en niños un poco más mayores (6 meses a 5 años) que han sufrido infecciones previas, prima una respuesta adaptativa que les hace más susceptibles de desarrollar malaria cerebral (Brian de Souza *et al.*, 2009; Warrell, 1989).

Existen moléculas del parásito (e. g. , el glicosil-fosfatidil-inositol) que actúan como toxinas pudiendo unirse a los receptores del sistema inmune innato del hospedador y desencadenar la liberación de citoquinas proinflamatorias como interleukina-1, interleukina-6, factor estimulador de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) y linfotoxina- α (LT- α), así como la producción de superóxidos y óxido nítrico (Engwerda *et al.*, 2002; van der Heyde *et al.*, 2006). La superproducción de óxido nítrico parece tener un papel central en el desarrollo de la malaria cerebral ya que presenta funciones pleiotrópicas que afectan al secuestro, la inflamación y la homeostasis (van der Heyde *et al.*, 2006). Además, puede ser también un efector crítico para la secreción de TNF- α durante la patogénesis de la misma (Idro *et al.*, 2005).

Las citoquinas, a su vez, pueden producir la alteración de la permeabilidad en la barrera hematoencefálica (Randall & Engwerda, 2010), suprimir la producción de eritrocitos en la médula ósea (Chen *et al.*, 2000), ocasionar daño de la función neuronal, viabilidad y plasticidad del cerebro (Di Filippo *et al.*, 2008), e incrementar la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, facilitando el secuestro de glóbulos rojos infectados (Chen *et al.*, 2000; Schofield & Grau, 2005; van der Heyde *et al.*, 2006) y la aparición de fiebre (Chen *et al.*, 2000). La fiebre puede producir, a su vez, un incremento en la expresión de moléculas como PfEMP-1 en los eritrocitos infectados, lo que también favorecerá su secuestro (Brian de Souza *et al.*, 2009; Combes *et al.*, 2010). Sin embargo, hay autores que proponen que es el secuestro el agente desencadenante capaz de producir la activación endotelial y la producción de citoquinas (Armah *et al.*, 2005; Franke-Fayard *et al.*, 2005; Medana *et al.*, 2001). Por otro lado, el daño tisular tras la liberación de citoquinas parece ser un factor de riesgo en el desarrollo de secuelas neurológicas (Holding & Snow, 2001).

La malaria cerebral se asocia también con un fallo en la función de los macrófagos y a una respuesta inmune tipo TH-1, en la que, además de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ y TNF- α , los linfocitos T colaboradores (CD4+), los linfocitos T citotóxicos (CD8+) y las células NK “natural killer” juegan el papel más importante (Bentivoglio *et al.*, 2010; Combes *et al.*, 2010; Hansen & Schofield, 2010). En la Figura 8 se resumen los principales mecanismos que se han postulado como implicados en el desarrollo de la malaria cerebral.

Los individuos que desarrollan malaria cerebral presentan elevadas concentraciones de IFN- γ y TNF- α en plasma (Brian de Souza *et al.*, 2009; Idro *et al.*, 2005) y en órganos como el cerebro (Chen *et al.*, 2000). Su neutralización previene del desarrollo de malaria cerebral en modelos de ratón susceptibles, por lo que sus niveles parecen jugar un papel crítico en la patogénesis de la malaria experimental murina (Brian de Souza *et al.*, 2009). Sin embargo, estas citoquinas parecen tener un papel dual. Por un lado, son necesarias para que el hospedador pueda combatir los parásitos, pero por otro, su sobreproducción puede ser deletérea para el hospedador (Chen *et al.*, 2000; de Souza & Riley, 2002; Vigario *et al.*, 2007), ya que parece que estas citoquinas podrían alterar la transmisión sináptica (Beattie *et al.*, 2002; Vikman *et al.*, 2001). Algunos estudios proponen que IFN- γ puede tanto promover como

inhibir el desarrollo de la malaria cerebral, dependiendo de la interacción específica celular y el momento de la infección (Amante *et al.*, 2007). Algo similar ocurre con $\text{TNF-}\alpha$, donde polimorfismos en la región promotora del gen que la codifica se han asociado con un aumento del riesgo de padecer malaria cerebral y muerte (Idro *et al.*, 2005), favoreciendo la ruptura de vasos sanguíneos y la aparición de hemorragias (Lou *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002), además de la degeneración neuronal (Mishto *et al.*, 2006). Por tanto, ambas citoquinas podrían tener efectos deletéreos tanto en la protección del cerebro como en la plasticidad sináptica (Di Filippo *et al.*, 2008; Lisak *et al.*, 2007).

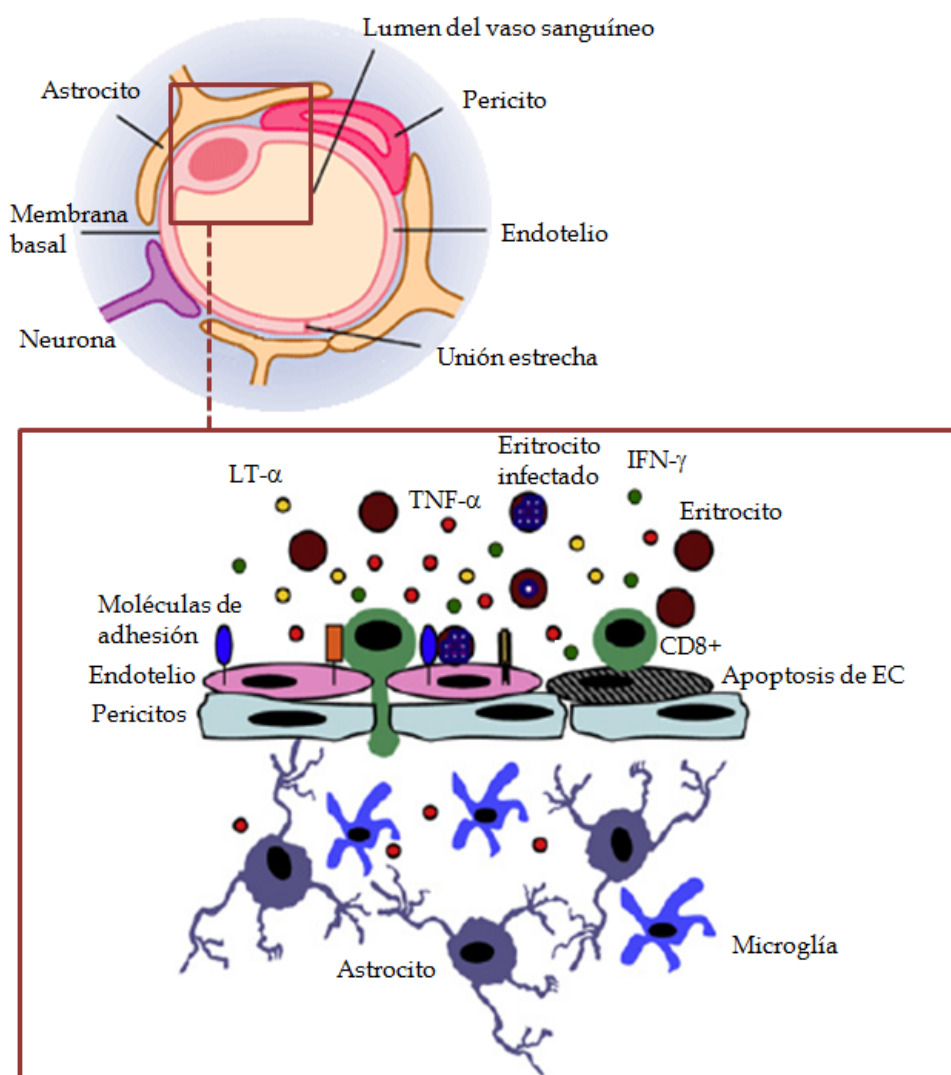


Figura 8.-Procesos neuroinflamatorios situados en la interfase entre el espacio intravascular y el sistema nervioso central. En la parte superior se muestra un esquema representativo de esta interfase, donde las células endoteliales del cerebro que forran los microvasos cerebrales constituyen la barrera hematoencefálica. En la inferior, aparece un esquema representativo de los principales factores implicados en el proceso inflamatorio durante la malaria cerebral (Francis *et al.*, 2003; Randall & Engwerda, 2010).

Estudios recientes proponen que la protección frente al desarrollo de malaria cerebral está más asociada al papel que juega LT- α que al de TNF- α , como se consideró inicialmente (Engwerda *et al.*, 2002; Weiser *et al.*, 2007). Así, mientras que ratones deficientes en LT- α e IFN- γ no adquieren síntomas cerebrales cuando se infectan con *Plasmodium*, los ratones deficientes solamente en TNF- α sucumben a la enfermedad (Parekh *et al.*, 2006). Es más, el tratamiento con anticuerpos monoclonales frente a TNF- α de niños que padecen malaria cerebral no favorece su recuperación (Kwiatkowski *et al.*, 1993). Sin embargo, aunque también se han observado elevados niveles LT- α en sueros de pacientes de malaria (Clark *et al.*, 1992a), su papel en la malaria cerebral necesita confirmación (Combes *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha visto que estas citoquinas pueden tener capacidad de intercomunicarse y por tanto un potencial efecto sinérgico. Así, IFN- γ puede incrementar los niveles de TNF- α (Weiser *et al.*, 2007) y tanto LT- α como TNF- α incrementar también los niveles de IFN- γ (Engwerda *et al.*, 2002).

Por último, se han descrito estas tres citoquinas proinflamatorias como principales mediadores de la inducción de algunas moléculas de adhesión como son ICAM-1, VCAM-1, P-selectina y E-selectina (Chen *et al.*, 2000; Engwerda *et al.*, 2002; Hunt & Grau, 2003; Lou *et al.*, 2001; Weiser *et al.*, 2007) las cuales parecen participar en el fenómeno de citoadherencia. TNF- α induce la expresión de ICAM-1, VCAM-1, E-selectina y P-selectina (Chakravorty *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2000; Pino *et al.*, 2005; Weiser *et al.*, 2007), LT- α puede inducir ICAM-1 y VCAM-1 (Engwerda *et al.*, 2002; Weiser *et al.*, 2007) y IFN- γ lo hace con ICAM-1 (Chen *et al.*, 2000). Además de estos efectos se ha descrito que existe uno sinérgico entre todas ellas (Weiser *et al.*, 2007). Sin embargo, ya que no se ha encontrado una asociación clara entre la producción de estas citoquinas y los sitios de secuestro de parásitos (Idro *et al.*, 2005; Mishra & Newton, 2009), también se ha propuesto que los glóbulos rojos parasitados puedan incrementar los niveles de moléculas de adhesión como ICAM-1, directamente (Chakravorty *et al.*, 2008).

Muchas de estas moléculas también están presentes en leucocitos, por lo que los parásitos igualmente podrían interaccionar con estas células y activar el sistema inmune del hospedador favoreciendo el aclaramiento de los mismos. Además, se sabe que tanto los leucocitos como las células NK “natural killer” expresan NCAM,

aunque su funcionalidad en la infección no se ha investigado aun (Rowe *et al.*, 2009). Se debe también considerar que el incremento en la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio puede facilitar el secuestro de leucocitos y plaquetas en la microvasculatura del mismo. Así, por ejemplo, ICAM-1 está implicada en el reclutamiento de leucocitos (Sherman *et al.*, 2003) y la ausencia de esta molécula previene del secuestro de estas células en modelos murinos (Brian de Souza *et al.*, 2009; Chakravorty *et al.*, 2008), aunque este resultado contrasta con otros estudios que por el contrario sí observan una acumulación de leucocitos en ratones deficientes de esta molécula (Vigario *et al.*, 2007). Sin embargo, el papel de la P-selectina en el desarrollo de la malaria cerebral no parece estar relacionado con el secuestro de leucocitos, ya que ratones carentes de esta proteína están protegidos de sufrir esta patología independientemente de su capacidad de adhesión (Weiser *et al.*, 2007).

De hecho, se ha visto que en tejido cerebral aparecen leucocitos, monocitos y fagocitos con pigmento malárico entremezclados con los glóbulos rojos (Pongponratn *et al.*, 2003). Sin embargo, parece probable que a este nivel, haya diferencias sustanciales entre la malaria cerebral en adultos y niños con una acumulación de leucocitos intravasculares más pronunciada en niños (Schofield & Grau, 2005). La acumulación de estas células en los microcapilares puede influir tanto directa como indirectamente en el desarrollo de la patología a través de la producción de mediadores potencialmente deletéreos (Schofield & Grau, 2005; van der Heyde *et al.*, 2006).

A pesar de la gran cantidad de información que existe relativa a la neuroinflamación producida durante la malaria cerebral, por el momento no hay un consenso sobre la secuencia de eventos que se producen en su patogénesis. Por ejemplo, se desconoce si la inflamación cerebral precede o sigue al secuestro y si es la causa o la consecuencia de las lesiones que se producen (Brian de Souza *et al.*, 2009; Combes *et al.*, 2010).

Tampoco se conoce la importancia de los sucesos localizados en el tejido cerebral frente a los sistémicos. Lo que sí parece más probado es que el incremento en la expresión de las moléculas de adhesión inducido por citoquinas es

dependiente de tejido (van der Heyde *et al.*, 2006) y que el microambiente específico de los tejidos donde se produce este aumento de citoquinas tiene un mayor impacto en el pronóstico de la enfermedad (Amante *et al.*, 2007), siendo más importante la producción de éstas a nivel local que la que se ha encontrado en la circulación (Hunt & Grau, 2003; Schofield & Grau, 2005). Finalmente, parece ser que células específicas del cerebro, como son la microglia y astrocitos podrían también estar implicadas en el aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias en este órgano (de Souza & Riley, 2002).

Los procesos neuroinflamatorios producidos durante la infección son capaces de aumentar también la expresión de las subunidades catalíticas del inmunoproteasoma (Gavilan *et al.*, 2009; Konstantinova *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2010), que pueden sintetizarse en diversas regiones del cerebro y en distintos tipos celulares incluyendo neuronas, astrocitos, microglía y células endoteliales (Mishto *et al.*, 2006; Stohwasser *et al.*, 2000). Estas subunidades pueden desplazar a las correspondientes subunidades del proteasoma constitutivo (Figura 9), alterando así sus funciones.

Mientras que el proteasoma constitutivo está principalmente implicado en el procesamiento de las proteínas mal plegadas, el inmunoproteasoma media la presentación antigénica durante la inflamación y no puede realizar el procesamiento rutinario de proteínas (Groettrup *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2010). La actividad del proteasoma se controla a nivel de la expresión e incorporación de las subunidades que conforman su centro catalítico, que está formado por cuatro anillos (Figura 9). Los anillos externos contienen las subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 7$), por donde entran los sustratos y se liberan los productos. Los anillos internos contienen las subunidades β ($\beta 1$ - $\beta 7$), de las cuales $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ contienen los sitios activos (Seifert & Kruger, 2008). En el cambio al inmunoproteasoma, estas subunidades están sustituidas por las correspondientes $\beta 1i$ (o LMP2), $\beta 2i$ (o MECL1) y $\beta 5i$ (o LMP7), (Kloetzel, 2004). Esta transformación podría inducir la acumulación de proteínas mal plegadas, pudiendo ocasionar daño en el funcionamiento neuronal y en la función sináptica, contribuyendo así a distintas alteraciones neurocognitivas (Gavilan *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2010).

Se ha visto que mediadores proinflamatorios como IFN- γ y TNF- α son capaces de inducir la expresión de las subunidades del inmunoproteasoma, probablemente a nivel local y dependiente de tejido (Gavilan *et al.*, 2009; Groettrup *et al.*, 2010; Kloetzel, 2004; Nguyen *et al.*, 2010). Por tanto, se podría esperar un aumento de las mismas debido al incremento de estas dos citoquinas durante la malaria cerebral (Chen *et al.*, 2000). Aunque se ha puesto de manifiesto la inducción del inmunoproteasoma en alteraciones del sistema nervioso central (Ferrer *et al.*, 2004; Gavilan *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2010), sin embargo, por ahora no existen estudios que lo asocien a la patogénesis de la malaria cerebral.

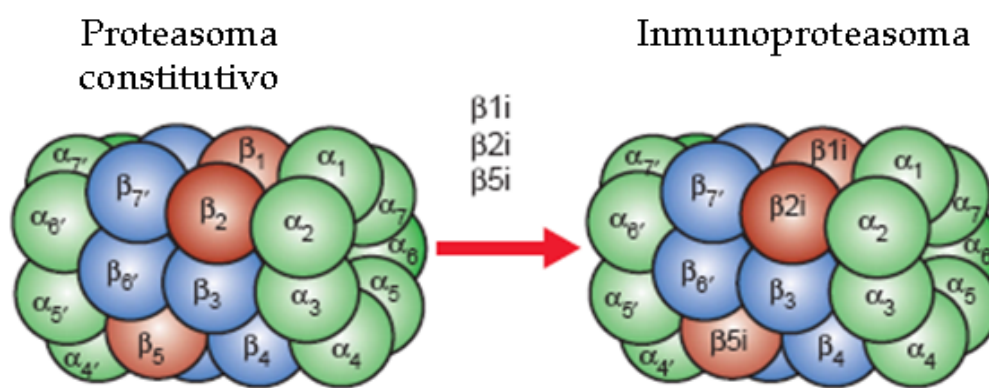


Figura 9.- Estructura del centro catalítico del proteasoma constitutivo y del inmunoproteasoma. Tres subunidades son responsables del cambio funcional que sufre el proteasoma constitutivo (Kloetzel, 2004).

2.4.2.3.-Alteraciones en la neuroprotección

El balance entre las vías neuroprotectoras y neurotóxicas parece ser crítico en el desarrollo de la malaria cerebral (Delahaye *et al.*, 2007; Idro *et al.*, 2010b). La plasticidad sináptica, responsable de que el cerebro adapte su respuesta a la experiencia y al entorno (Lu, 2003), también parece estar implicada en su desarrollo, ya que en niños jóvenes se ha visto que tienen una mejor recuperación de la enfermedad debido a una mayor plasticidad neuronal (Holding & Snow, 2001).

Así, diversos estudios llevados a cabo, tanto en muestras post-mortem como en modelos murinos de malaria cerebral, han permitido observar daños en distintas poblaciones celulares que conforman el sistema nervioso central, como son las

células endoteliales, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía (Bentivoglio *et al.*, 2010; Medana *et al.*, 2007; Medana *et al.*, 2001; Miu *et al.*, 2008; Penet *et al.*, 2005). Estudios con cerebros procedentes de pacientes afectados por esta enfermedad han puesto de manifiesto que células hemáticas extravasadas se entremezclan con todos estos tipos celulares (Pongponratn *et al.*, 2003).

Durante la malaria cerebral se ha observado que las células endoteliales pueden sufrir apoptosis (Miu *et al.*, 2008). Además de la implicación en el secuestro y en la respuesta inmune del hospedador, la propia presencia del parásito parece jugar un papel importante en el daño producido durante la malaria cerebral. Así, estirpes de *Plasmodium* procedentes tanto de laboratorio como de aislados clínicos humanos han mostrado tener capacidad potencial de producir la muerte de células endoteliales (Pino *et al.*, 2003b; Toure *et al.*, 2008). De igual forma, existen proteínas del parásito que son capaces por sí mismas de producir la disrupción de la barrera hematoencefálica (Chakravorty *et al.*, 2008).

Además del daño en las células endoteliales, también se ha visto muerte de astrocitos durante la malaria cerebral (Miu *et al.*, 2008). Los astrocitos son el tipo celular más numeroso en el sistema nervioso central con diversas propiedades que les permite contribuir al mantenimiento de la función cerebral normal. Estas células promueven la supervivencia de las neuronas, interaccionan con éstas determinando los procesos cognitivos y la memoria y se adhieren a las células del endotelio contribuyendo a la formación de la barrera hematoencefálica (Hunt *et al.*, 2006). Algunos autores sugieren que durante la malaria cerebral se produce daño en los astrocitos (Figura 10) como consecuencia de la producción de factores citotóxicos por los leucocitos (Bentivoglio *et al.*, 2010).

En estudios llevados a cabo con muestras post-mortem de cerebros obtenidos a partir de individuos con malaria cerebral así como durante la malaria cerebral experimental murina, se ha demostrado que la microglía sufre un proceso de activación (Figura 10) (Bentivoglio *et al.*, 2010; Medana & Turner, 2006). Esta activación se ha relacionado con disfunciones cognitivas observadas en la malaria cerebral murina (Brian de Souza *et al.*, 2009), ya que la microglía contribuye a diferentes formas de plasticidad sináptica (Di Filippo *et al.*, 2008).

Tanto en pacientes como en modelos murinos de malaria cerebral, se ha descrito daño y muerte neuronal (Idro *et al.*, 2010a; Miu *et al.*, 2008). Un estudio retrospectivo con niños kenianos ha puesto de manifiesto que existe una relación inversa entre el daño axonal y algunos parámetros indicativos de gravedad de la infección (Medana *et al.*, 2007). Así, algunos autores sugieren que el daño neuronal puede ser un proceso clave en el desarrollo de la malaria cerebral (Rao *et al.*, 2010). La activación de la microglía y la producción de citoquinas en el sistema nervioso central también produce daño en las neuronas que se manifiesta clínicamente como un daño cognitivo a largo plazo (John *et al.*, 2008). Además, la ruptura de la barrera hematoencefálica podría exponer a neuronas perivasculares y otras poblaciones celulares, como astrocitos y microglía, a proteínas plasmáticas y distintos mediadores intercelulares, como citoquinas (Idro *et al.*, 2005; Zapata-Zapata & Blair-Trujillo, 2003).

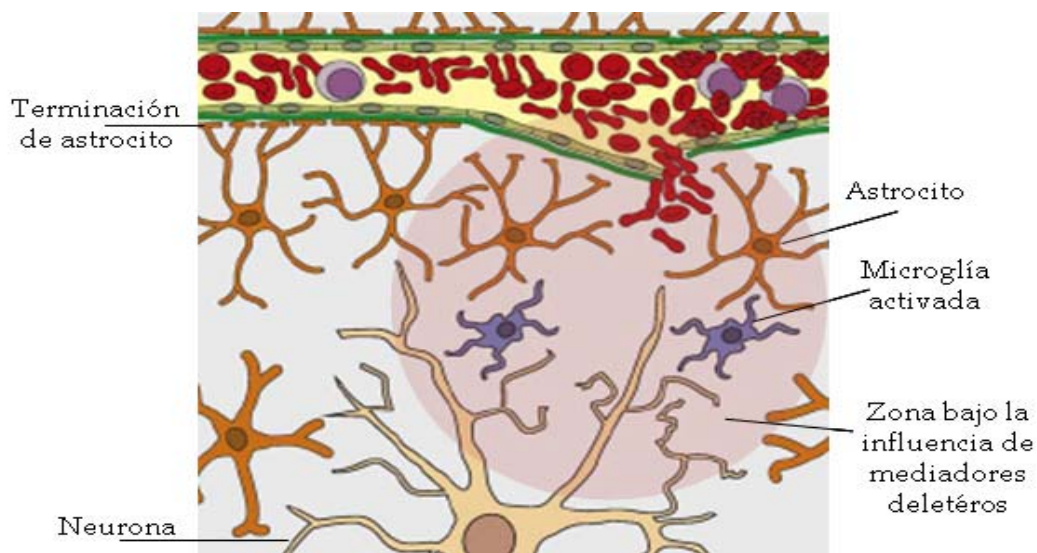


Figura 10.- Alteraciones histopatológicas del sistema nervioso central producidas en la malaria cerebral. Durante la malaria cerebral se producen cambios en los astrocitos y especialmente en la microglía. La microglía se activa y las terminaciones de los astrocitos, que en condiciones normales contribuyen a la formación de la barrera hematoencefálica, tras la aparición de hemorragias, se ven alteradas. La barrera hematoencefálica puede verse afectada, favoreciéndose así un incremento de mediadores en la zona perivascular, que podría conducir a un daño neuronal (Bentivoglio *et al.*, 2010; Idro *et al.*, 2010b; John *et al.*, 2008).

Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento del sistema nervioso central sintetizadas por las neuronas y otras células nerviosas (Ebadi *et al.*, 1997) que participan en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular en el cerebro, modulando así la plasticidad sináptica (Ebadi *et al.*, 1997; Poo, 2001) y

ejerciendo profundos efectos en el sistema nervioso, tanto en estados normales como patológicos. Las neurotrofinas están implicadas en la respuesta al daño que se produce por estrés oxidativo en el cerebro (Ebadi *et al.*, 1997) y juegan un papel regulatorio importante en el desarrollo y función de la sinapsis. De esta manera, modulan la eficacia de la transmisión sináptica (Lu, 2003).

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés “brain-derived neurotrophic factor”) es una de las neurotrofinas más abundantes del mismo (Cunha *et al.*, 2010). Se trata de una proteína homodimérica que es sintetizada y liberada por las neuronas, microglía activada, células endoteliales y leucocitos (Enstrom *et al.*, 2008; Lessmann & Brigadski, 2009; Madri, 2009; Ruprecht *et al.*, 2002). En las neuronas de regiones cerebrales con abundante expresión de BDNF, como son hipocampo y cerebelo, este marcador neurotrófico se transporta tanto hacia las fibras dendríticas como hacia los axones (Figura 11) (Lessmann & Brigadski, 2009).

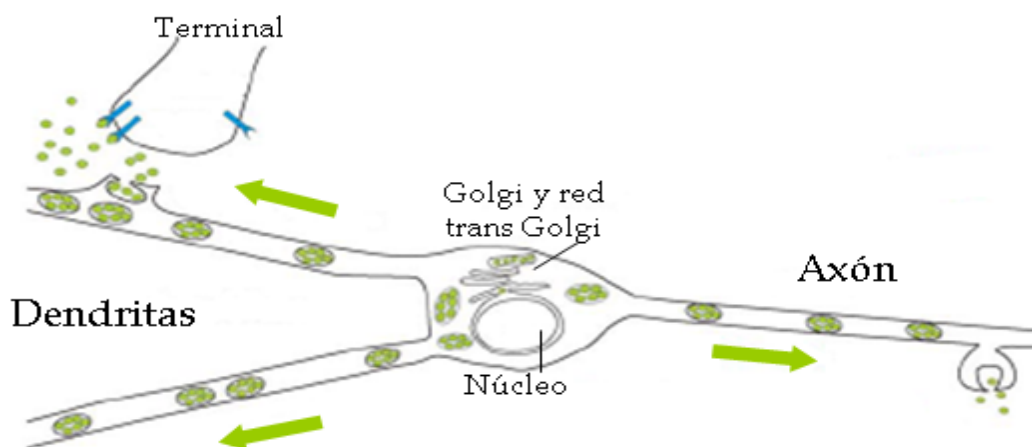


Figura 11.- Transporte del BDNF en las neuronas. El BDNF sintetizado en el núcleo se dirige hacia el Golgi y red trans Golgi para transportarse hacia los axones y dendritas a través de las vesículas secretoras (Lessmann & Brigadski, 2009).

El BDNF actúa sobre neuronas, astrocitos y endotelio (Ebadi *et al.*, 1997; Enstrom *et al.*, 2008). Entre sus funciones está proteger a las neuronas (Enstrom *et al.*, 2008) y promover su supervivencia, proliferación, crecimiento, y diferenciación. Además está implicado en la regeneración de axones y en la transmisión sináptica (Cunha *et al.*, 2010; Greenberg *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2010;

Waterhouse & Xu, 2009; Winkelstein & Kras, 2010), regulando las propiedades de las neuronas (Enstrom *et al.*, 2008). También promueve la supervivencia de otros tipos celulares como las endoteliales (Madri, 2009; Ruprecht *et al.*, 2002).

El BDNF ha emergido como un importante regulador de la plasticidad sináptica capaz de controlar funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria en el sistema nervioso central (Cunha *et al.*, 2010; Greenberg *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 2000; Zuccato & Cattaneo, 2009), mediante la activación de múltiples vías de señalización que actúan de manera concertada (Cunha *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). También se ha visto que protege al cerebro de la apoptosis que se produce como resultado de la inflamación (Enstrom *et al.*, 2008). Por tanto, en condiciones de daño cerebral, como es la interrupción del flujo sanguíneo, se promueve la activación de proteínas de plasticidad como el BDNF para inducir una recuperación funcional del órgano (Nagy *et al.*, 2002). Por ello, se ha sugerido que cambios en el nivel o distribución del BDNF pueden ser cruciales en la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas en humanos (Zuccato & Cattaneo, 2009). Hasta la fecha, se han puesto de manifiesto variaciones en la expresión de este marcador en enfermedades como Alzheimer y Parkinson (Zuccato & Cattaneo, 2009), sin embargo su expresión durante la patogénesis de la malaria cerebral no se ha estudiado todavía.

El BDNF puede interactuar con la NCAM para mediar la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica (Kiss *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2007; Vutskits *et al.*, 2001). La NCAM forma parte de una familia de glicoproteínas de superficie celular y juega un papel importante en el desarrollo normal del cerebro (Aisa *et al.*, 2010). Se localiza en neuronas, glía, astrocitos, células endoteliales y células sensoriales (Gingras *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2007), y se le atribuyen funciones en la migración celular, supervivencia neuronal, crecimiento axonal y dendrítico, regeneración axonal, sinaptogénesis, estabilización sináptica y, la plasticidad sináptica. Por tanto, al igual que el BDNF, esta molécula está implicada en la regulación de procesos neurocognitivos como la memoria y el aprendizaje. (Aisa *et al.*, 2010; Bisaz *et al.*, 2009; Gingras *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2007). También parece que sensibiliza a las neuronas frente a la acción de BDNF (Muller *et al.*, 2000) y que interacciona con sus cascadas de

señalización (Gingras *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2007). Al igual que el marcador neurotrófico, podría estar implicada en la recuperación funcional del cerebro tras el daño (Kiss *et al.*, 2001).

Por último, el BDNF también puede interaccionar con el proteasoma e incluso parece que su regulación está muy relacionada con la funcionalidad del mismo. Además, se piensa que la inhibición de ambos actúa de forma sinérgica en la muerte neuronal (Seo *et al.*, 2008). El proteasoma también está implicado en la supervivencia, diferenciación, desarrollo y muerte celular (Ferrer *et al.*, 2004; Konstantinova *et al.*, 2008), así como en la plasticidad sináptica (Dong *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010) y, por tanto, en la formación del aprendizaje y memoria (Bingol & Sheng, 2011; Nguyen *et al.*, 2010).

2.4.2.4.-Estrés oxidativo

El estrés oxidativo que se produce en un ambiente celular es el resultado de un desequilibrio entre los antioxidantes y los oxidantes generados de forma natural y tiene lugar por un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno o por una disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes (Postma *et al.*, 1996). Entre todos los órganos del cuerpo, el cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo debido a su elevada demanda de oxígeno, a los elevados niveles de ácidos grasos poliinsaturados, elevados niveles de iones metálicos de transición redox y bajos niveles de antioxidantes (Butterfield *et al.*, 2007). Se ha descrito que este tipo de daño juega un papel crucial en la progresión de diversos desórdenes neurodegenerativos. Los altos niveles de lactato asociados al desarrollo de la malaria cerebral, junto con la reducida deformabilidad de los eritrocitos, podrían atribuirse a un estado redox alterado durante el desarrollo de esta complicación neurológica (van der Heyde *et al.*, 2006). Sin embargo, existen autores que cuestionan la importancia de las especies reactivas de oxígeno en la malaria cerebral (Sanni *et al.*, 1999).

Durante la malaria cerebral se acumulan especies reactivas de oxígeno producidas tanto por el hospedador como por el parásito (Figura 12), conduciendo a un equilibrio redox alterado (Pino *et al.*, 2005; Pino *et al.*, 2003a; Postma *et al.*, 1996;

Wiese *et al.*, 2006). Grandes cantidades de estas moléculas reactivas se generan a partir de leucocitos activados, como neutrófilos y monocitos (Hunt *et al.*, 2006; Postma *et al.*, 1996). También se ha descrito en estudios *in vitro* que las células endoteliales durante la adhesión de los parásitos pueden ser otra fuente de especies reactivas de oxígeno (Pino *et al.*, 2005; Taoufiq *et al.*, 2006). En el parásito se producen este tipo de moléculas durante el proceso de degradación de la hemoglobina del eritrocito (Kumar *et al.*, 2008; Postma *et al.*, 1996; Taoufiq *et al.*, 2006), en el que, además, se genera hemo libre (Becker *et al.*, 2004). En el ambiente ácido de la vacuola digestiva del parásito, el hierro del grupo hemo se oxida de Fe(II) a Fe(III) con la consecuente producción de anión superóxido, que genera peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, altamente reactivos. Por ello, la mayor parte del hemo libre se detoxifica mediante su cristalización a hemozoína. Sin embargo, una pequeña cantidad escapa del proceso de neutralización (Becker *et al.*, 2004; Muller, 2004; Postma *et al.*, 1996). En presencia de especies reactivas de oxígeno, la hemoglobina se oxida, liberando más hemo libre. Por otro lado, el incremento en los niveles de hierro en un ambiente rico en oxígeno como el cerebro puede aumentar la producción de radicales libres (Butterfield *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008; Hunt & Stocker, 2007; Pamplona *et al.*, 2007) y un consecuente daño a nivel local.

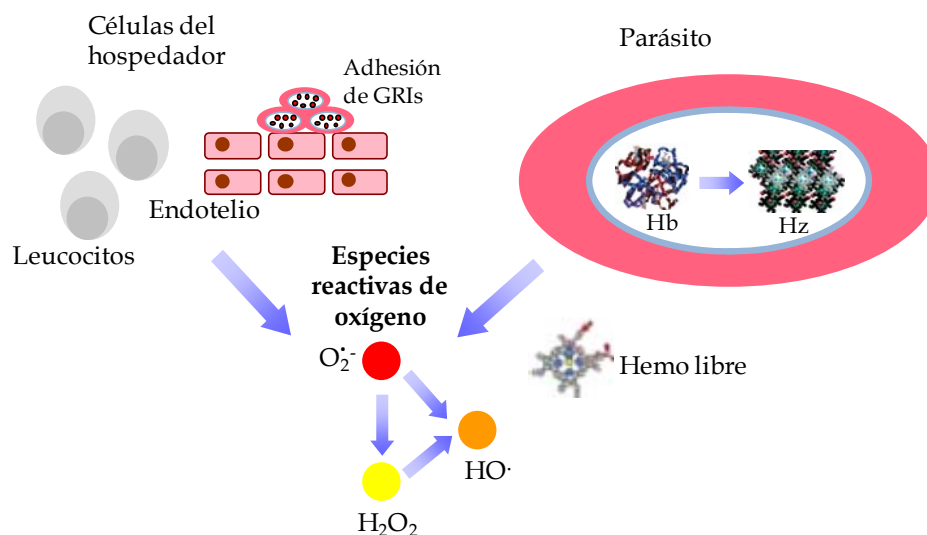


Figura 12.- Origen de la producción de especies reactivas de oxígeno durante la malaria cerebral. Las especies reactivas de oxígeno se pueden generar a partir de células del hospedador como leucocitos y células endoteliales durante la adhesión de glóbulos rojos infectados. El parásito también genera especies reactivas de oxígeno en el proceso de degradación de la hemoglobina a hemozoína (Pino *et al.*, 2005; Postma *et al.*, 1996; Taoufiq *et al.*, 2006). GRI: glóbulos rojos infectados; Hb: hemoglobina; Hz: hemozoína.

Los efectos de las especies reactivas de oxígeno en la infección malárica podrían ser tanto beneficiosos como patológicos, dependiendo de la cantidad y el lugar de producción. Así, aunque pueden combatir la infección, también pueden estar implicados en cambios patológicos que acontecen en tejidos del hospedador (Pino *et al.*, 2005; Postma *et al.*, 1996). Ya en los años 80, Gilbert y colaboradores sugirieron que las especies reactivas de oxígeno jugaban un papel importante en muchas patologías humanas y que la malaria podría ser una de ellas (Gilbert, 1981). Este daño oxidativo parece afectar sobre todo a las células endoteliales y a la barrera hematoencefálica, contribuyendo a las manifestaciones clínicas características de la malaria cerebral (Becker *et al.*, 2004; Buffinton *et al.*, 1988; Chakravorty *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2005; Pongponratn *et al.*, 2003; Postma *et al.*, 1996). De hecho, se ha puesto de manifiesto que existe estrés oxidativo en células endoteliales de cerebro obtenidas a partir de pacientes que fallecen por esta enfermedad (Wiese *et al.*, 2006). En presencia de especies reactivas de oxígeno, el hemo libre puede ser altamente citotóxico para las células endoteliales (Ferreira *et al.*, 2008; Hunt & Stocker, 2007; Pamplona *et al.*, 2007). Por último, las especies reactivas de oxígeno pueden contribuir también al daño neuronal (Becker *et al.*, 2004; Hunt *et al.*, 2006) y a la degeneración de la neuroglía (Wiese *et al.*, 2006).

La peroxidación lipídica, un tipo de oxidación de lípidos mediada principalmente por especies reactivas de oxígeno aparece incrementada en el líquido cerebroespinal en pacientes de malaria cerebral (Postma *et al.*, 1996), en cerebros de ratones que sufren esta complicación (Reis *et al.*, 2010) y en glóbulos rojos infectados con *P. berghei* (Postma *et al.*, 1996). Este hecho parece indicar que estas moléculas median el daño neurológico en esta enfermedad, lo que a su vez está avalado por el efecto protector frente al desarrollo de malaria cerebral de diversas sustancias antioxidantes (Becker *et al.*, 2004; Postma *et al.*, 1996; Taoufiq *et al.*, 2006; Thumwood *et al.*, 1989). Recientemente se ha observado también que el tratamiento de ratones susceptibles a esta complicación con antioxidantes previene el desarrollo de un daño cognitivo permanente (Reis *et al.*, 2010), por lo que las especies reactivas de oxígenos parecen estar también asociadas a la aparición de secuelas neurológicas.

Las proteínas son las principales dianas del efecto oxidante de las especies reactivas de oxígeno y de sus productos secundarios (Dalle-Donne *et al.*, 2006a). La oxidación en las proteínas puede producir cambios conformacionales, dimerizaciones o agregaciones de las mismas capaces de inducir una pérdida estructural o funcional. Estas proteínas oxidadas podrían acumularse formando inclusiones citoplasmáticas, alterando funciones celulares como son los procesos enzimáticos, el mantenimiento de la estructura celular, el recambio proteico, la expresión y regulación génica, la modulación de la señalización celular y la inducción de apoptosis y necrosis, entre otras (Butterfield *et al.*, 2007; Cecarini *et al.*, 2007). Por todo ello, la oxidación de proteínas desempeña un papel fundamental en el desarrollo de múltiples enfermedades neurológicas (Cecarini *et al.*, 2007).

A pesar de las distintas modificaciones oxidativas que pueden sufrir estas moléculas, la carbonilación representa el producto mayoritario de la oxidación proteica (Cecarini *et al.*, 2007; Shacter, 2000b). Una de las consecuencias más destacables de la presencia de carbonilos en ellas es que éstos pueden reaccionar con los grupos α -amino de las lisinas de cadenas adyacentes. De esta forma, se pueden producir entrecruzamientos intra o intermoleculares que promueven la formación de agregados proteicos, que no son degradados por los mecanismos normales de degradación e inhiben los mecanismos proteolíticos (Cecarini *et al.*, 2007). Recientemente se han visto elevados niveles de carbonilación proteica en la membrana de eritrocitos infectados por *P. falciparum* (Mendez *et al.*, 2011), incluso las proteínas del parásito también son altamente susceptibles a la carbonilación (Radfar *et al.*, 2008).

Para defenderse del estrés oxidativo y del daño que éste puede ocasionar, la célula cuenta con un gran número de sistemas de defensa antioxidante, entre los que se incluyen las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el ciclo reductor del glutatión (Figura 13). Las propias especies reactivas de oxígeno son capaces de inducir la expresión de enzimas antioxidantes y mecanismos de defensa relacionados (Calabrese *et al.*, 2007). Sin embargo, hay autores que sugieren que estos sistemas antioxidantes deben fallar durante la malaria cerebral (Postma *et al.*, 1996).

La enzima SOD es una defensa celular fundamental frente al estrés oxidativo mediante la reducción del radical superóxido a peróxido de hidrógeno. En mamíferos existen tres tipos de isoenzimas: (i) SOD-1, dependiente de cobre y zinc, que se localiza sobre todo en el citoplasma, aunque también se puede encontrar en peroxisomas y núcleo y representa una gran parte de la fracción proteica celular; (ii) SOD-2, dependiente de manganeso, que se localiza en la mitocondria y (iii) SOD-3, también denominada EC-SOD, dependiente de cobre y zinc, que se localiza principalmente en el espacio extracelular. En cerebro se ha visto la expresión de las tres isoenzimas (Maier & Chan, 2002; Ookawara *et al.*, 1998).

El peróxido de hidrógeno, producto de las reacciones que catalizan estas enzimas, es posteriormente transformado a agua por las enzimas catalasa o glutathion peroxidasa (GPX), que parecen formar parte de dos sistemas antioxidantes diferentes (Cisneros *et al.*, 1997).

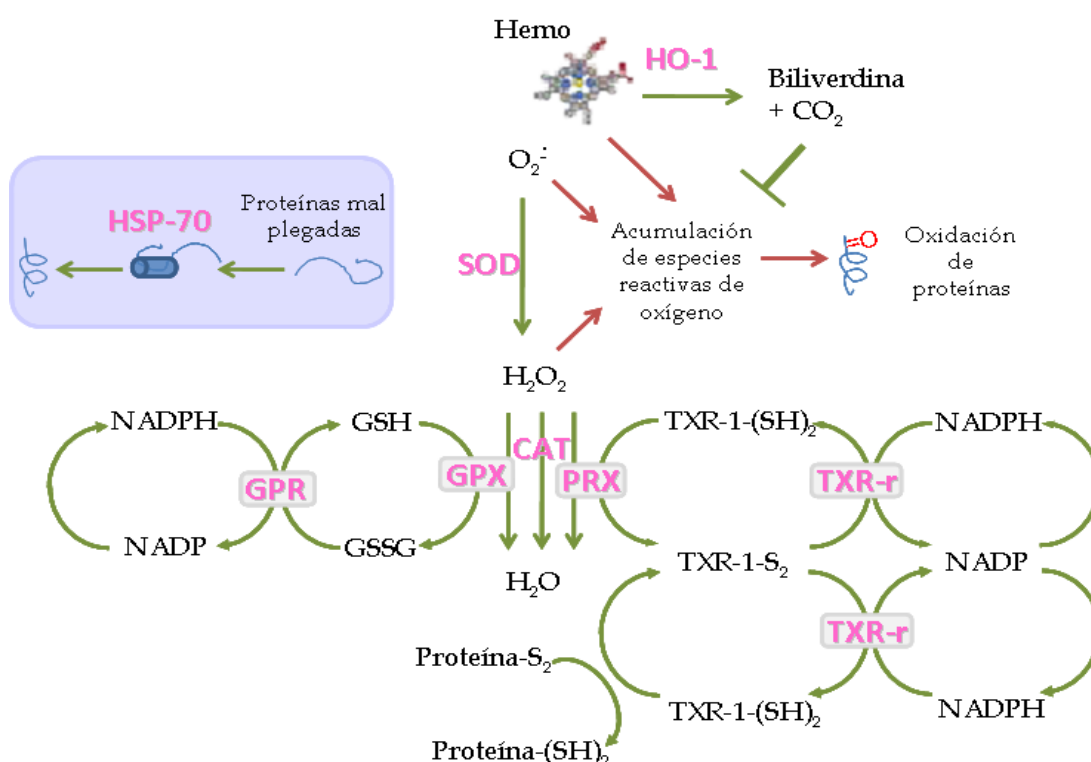


Figura 13.- Sistemas antioxidantes de la célula hospedadora. Entre los mecanismos antioxidantes celulares destacan las superóxidos dismutasas; la catalasa; el ciclo del glutathion, el sistema tioredoxina, la hemo oxigenasa-1 y las proteínas de choque térmico, como la HSP70 (Calabrese *et al.*, 2007; Dringen *et al.*, 2005). GPR: glutathion peroxidasa; PRX: peroxiredoxina; TXR-r: tioredoxina reductasa; GSH/GSSG: glutathion reducido/oxidado.

Las reacciones que favorecen la producción de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo se representan en rojo, mientras que aquellas con efectos antioxidantes se representan en verde.

La CAT es una enzima localizada en los peroxisomas que acepta como sustrato el peróxido de hidrógeno, pero no hidroperóxidos orgánicos. Esta enzima, expresada en todo tipo de células cerebrales, es particularmente efectiva a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Dringen *et al.*, 2005) y parece actuar de forma coordinada con la SOD (Cisneros *et al.*, 1997). La GPX utiliza el tripéptido glutathion reducido como donador de electrones para reducir el peróxido de hidrógeno, aunque también reduce hidroperóxidos orgánicos (Dringen *et al.*, 2005). El glutathion oxidado es rápidamente reducido por la glutathion reductasa, utilizando el NADPH generado en varias reacciones intracelulares (Pino *et al.*, 2005; Pino *et al.*, 2003a; Postma *et al.*, 1996). Aunque existen diferentes isoformas de glutathion peroxidasa, la GPX-1, localizada en el citosol, parece ser crítica para la defensa antioxidante del cerebro (Dringen *et al.*, 2005).

Además de todas las anteriores, el cerebro cuenta con otro conjunto de moléculas implicadas en la eliminación del estrés oxidativo, como las proteínas de choque térmico, las hemo oxigenasas y el sistema tiorredoxina (Figura 13) (Calabrese *et al.*, 2007). Este último, constituido por la tiorredoxina (TRX) y la tiorredoxina reductasa está implicado en la reducción de puentes disulfuro de las proteínas. La tiorredoxina reductasa puede reducir directamente a hidroperóxidos lipídicos y al peroxinitrito, mientras que la TRX secuestra directamente especies reactivas de oxígeno como el radical hidroxilo. Cuando se acopla a peroxiredoxinas, TRX es capaz de reducir peróxidos. Este sistema también puede interactuar con el sistema del glutathion y parece estar implicado en la transducción de señales, la regulación génica y en acciones neuroprotectoras. La TRX-1 (citósólica) se expresa ampliamente en cerebro y parece mediar la supervivencia neuronal en condiciones de estrés oxidativo (Calabrese *et al.*, 2007; Patenaude *et al.*, 2005).

Las proteínas de choque térmico (HSPs, del inglés “heat shock proteins”) facilitan el correcto plegamiento del resto de las proteínas, previniendo su agregación, situación asociada, entre otras, a una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno. Las HSPs son capaces de romper los agregados y asistir en el proceso de re-plegamiento. Sin embargo, en aquellos casos en los que las proteínas no pueden ser rescatadas, las dirigen hacia el proteasoma para su reciclaje. La más estudiada es la forma inducible HSP70, que media acciones citoprotectoras

(Calabrese *et al.*, 2007; Giffard *et al.*, 2008). La hemo oxigenasa-1 (HO-1) pertenece a la familia de las HSPs. Su inducción es una de las primeras respuestas celulares frente al daño tisular. Ejerce su papel neuroprotector mediante la degradación del grupo hemo, la producción de monóxido de carbono, que puede secuestrar hierro, y la producción de biliverdina, posteriormente reducida a bilirrubina, que protege frente a los efectos citotóxicos causados por el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito (Calabrese *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2006).

El parásito también contribuye a la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno que él mismo está produciendo. De hecho, induce una respuesta transcripcional antioxidante temprana en él como consecuencia del incremento en estas moléculas (Nogueira *et al.*). Por un lado, se ha demostrado que tanto *P. falciparum* como *P. berghei* presentan dos isoformas de la SOD. Sin embargo, es capaz de adoptar la SOD-1 del hospedador, que podría contribuir a la detoxificación de aniones superóxido producidos en su metabolismo (Becker *et al.*, 2004; Muller, 2004; Postma *et al.*, 1996). Por otro lado, el parásito carece de catalasa y su glutathion peroxidasa utiliza preferentemente la tioredoxina como cofactor (Becker *et al.*, 2004; Muller, 2004). Aunque *Plasmodium* carezca de catalasa y de una eficiente glutathion peroxidasa, contiene numerosas peroxidasas con gran variedad de sustratos. También posee un sistema de tioredoxina funcional, pero curiosamente, su tioredoxina típica (PfTRX1) es mejor sustrato para la tioredoxina reductasa humana (Becker *et al.*, 2004).

Por último, cabe destacar que los niveles de varias moléculas antioxidantes como HSP70, HO-1, TRX-1, GPX, CAT y SOD se han visto alterados en cerebro a lo largo de otras enfermedades neurodegenerativas (Calabrese *et al.*, 2007). La administración de enzimas como la SOD, la CAT y la HO-1 protege frente al daño oxidativo en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* de malaria cerebral (Hunt *et al.*, 2006; Postma *et al.*, 1996). Son varios los estudios que sugieren que algunas de estas moléculas podrían ser factores importantes en el desarrollo de esta enfermedad, aunque su inducción y papel fisiológico son aún objeto de debate (Medana *et al.*, 2001; Pamplona *et al.*, 2007; Postma *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 2005).

2.5.- MODELOS EXPERIMENTALES DE MALARIA CEREBRAL

Las principales estrategias para el estudio de la patogénesis de la malaria cerebral se basan en el uso de muestras post-mortem obtenidas a partir de biopsias de pacientes afectados, estudios *in vitro* con células animales o bien modelos animales (Idro *et al.*, 2005). Solamente estos últimos permiten un estudio experimental completo del proceso así como un seguimiento temporal detallado y una suficiente casuística estadística. Por ello, se han desarrollado distintos modelos animales infectados con eritrocitos parasitados por distintas estirpes de *Plasmodium*, que permiten una gran reproducibilidad, fácil manejo y elevada semejanza con las características patológicas que se producen en la malaria humana (Lackner *et al.*, 2006; Lou *et al.*, 2001). Sin embargo, muchos autores defienden la idea de que no existe ningún modelo animal fiable para el estudio de la malaria cerebral, ya que las características clínicas de la enfermedad humana aún no se han logrado reproducir en su totalidad (Idro *et al.*, 2005).

Por un lado, los modelos en primates, que se acercan más en términos clínicos a la patología en humanos, no son útiles para confirmar los eventos moleculares específicos que se producen en la malaria cerebral humana, debido a su naturaleza impredecible (de Souza & Riley, 2002; Lou *et al.*, 2001) ya que sólo un número limitado de animales desarrollan las complicaciones cerebrales (de Souza & Riley, 2002; Idro *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2001) y, además por razones éticas, los experimentos con estos animales están restringidos a un pequeño número de individuos (Brian de Souza *et al.*, 2009).

Los modelos murinos de malaria experimental son más versátiles y permiten el análisis de las interacciones moleculares y los cambios patológicos que ocurren en ella. Sin embargo, en la patología murina se observan algunas diferencias con respecto a la patología humana. Los parásitos no desarrollan “knobs”, el secuestro vascular de los eritrocitos infectados es escaso y aumenta en el caso de los leucocitos, y se considera que son los monocitos y las citoquinas inflamatorias los principales causantes de la enfermedad (Idro *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2001). De hecho, existe relación entre algunos signos clínicos como son ataxia, convulsiones y coma con el secuestro de leucocitos en la microvasculatura del cerebro (Rest, 1982). La

idea de que no existe un modelo animal murino adecuado para el estudio de la malaria cerebral humana debido a que en ratones se muestra un secuestro preferente de leucocitos puede replantearse en la actualidad, ya que en pacientes pediátricos también se ha visto la presencia de secuestro leucocitario (Idro *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2001). Además, existen algunos estudios que sí describen acumulación de eritrocitos infectados en el cerebro en distintos modelos murinos (Amante *et al.*, 2007; Hearn *et al.*, 2000; Jennings *et al.*, 1997; Lou *et al.*, 2001).

Existen otras relaciones entre la patología humana y la murina que justifican el uso experimental de estos modelos animales. La clínica comparte varios fenotipos de disfunción del sistema nervioso central, como parálisis, convulsiones, coma y un rápido deterioro una vez que se alcanzan los síntomas neurológicos (Carroll *et al.*, 2010). Tanto las lesiones anatomopatológicas más significativas, como son la alteración de la barrera hematoencefálica y las microhemorragias, como las principales células alteradas, son las mismas en ambas especies. Por otro lado, la respuesta inmune es también similar en ambas especies (Brown *et al.*, 2001; Lou *et al.*, 2001; Rest, 1982). Así, modelos experimentales murinos utilizando *P. berghei* como agente infeccioso han resultado muy útiles para estudiar el papel de diferentes factores inmunológicos como no inmunológicos del hospedador durante el desarrollo de la malaria cerebral (Brian de Souza *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2001).

En los estudios con modelos animales hay que tener en cuenta que además de las diferencias en la patogénesis de la enfermedad, el desarrollo de la misma también varía de acuerdo con las interacciones parásito-hospedador. Por ejemplo, los ratones de la estirpe CBA exhiben una patología vascular cerebral cuando se infectan con *P. berghei* ANKA, que no se produce cuando la infección es por *P. yoelii* o *P. vinckei*, aunque con este último los animales presentan otras características que son propias de la malaria grave de *P. falciparum*. Además, una misma especie de parásito también induce diferentes respuestas dependiendo de la cepa de ratón utilizada. Por ejemplo, la cepa CBA infectada con *P. berghei* ANKA desarrolla una forma de malaria cerebral fatal que ni siquiera puede prevenirse con tratamiento, lo que excluye este modelo en los ensayos de fármacos antimaláricos. Por el contrario, la cepa DBA/2 desarrolla un síndrome cerebral no fatal y BALB/c no desarrolla ninguna patología en el cerebro (Idro *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2001).

Uno de los modelos más utilizados por numerosos laboratorios y aceptado como el más manejable es la infección de ratones de la estirpe CBA o C57BL/6 con *P. berghei* ANKA, los cuales tras adquirir malaria cerebral desarrollan ataxia, convulsiones, fallo respiratorio, coma y muerte (Brian de Souza *et al.*, 2009; Idro *et al.*, 2005; Jennings *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de ser el más aceptado para estudios de malaria cerebral, el uso de este modelo genera controversia ya que algunos autores sostienen que no es del todo adecuado, pues se observa mayor secuestro de glóbulos blancos que de glóbulos rojos infectados (White *et al.*, 2010). La infección por *Plasmodium yoelii* en otras estirpes de ratones, como los ratones Swiss, produce un marcado secuestro cerebral de eritrocitos infectados (Brian de Souza *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2001). Sin embargo, la hiperparasitemia en sangre periférica asociada con esta infección no es típica en la malaria cerebral humana. *P. berghei* K173 también induce signos típicos de la malaria cerebral pero su dependencia de la dosis infecciosa limita su uso para el estudio de la misma (Brian de Souza *et al.*, 2009). En la Tabla 2 se describen distintos ejemplos de modelos *in vivo* utilizados para el estudio de la malaria cerebral murina.

Tabla 2. Modelos *in vivo* usados para el estudio de la malaria cerebral en ratón*

PARÁSITO	RATÓN	CARACTERÍSTICAS
<i>P.yoelii</i> 17XL	Ratón Swiss	Secuestro de eritrocitos infectados e hiperparasitemias
<i>P.berghei</i> ANKA	CBA/Ca	Malaria cerebral fatal + secuestro de leucocitos
	CBA/T6	Malaria cerebral no fatal + secuestro de leucocitos
	DBA/2	Malaria cerebral fatal + secuestro de leucocitos
	C57BL/6	Malaria cerebral fatal + secuestro de leucocitos
<i>P. berghei</i> K173	C57BL/6	Dosis-dependiente
<i>P.falciparum</i>	SCID	Secuestro de eritrocitos infectados

*Tomada y adaptada de (Brian de Souza *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2001; Willimann *et al.*, 1995).

2.5.1.- El modelo murino de *P. berghei* ANKA

La infección de ratones susceptibles de desarrollar malaria cerebral con *Plasmodium berghei* ANKA resulta un modelo interesante para el estudio de la histopatología del cerebro y la expresión clínica de la enfermedad durante la fase

asexual sanguínea dado el gran número de similitudes que se han descrito entre la patología murina y la humana (Brian de Souza *et al.*, 2009; Carvalho, 2010; Hunt *et al.*, 2006; Hunt & Grau, 2003; Hunt *et al.*, 2010; Lou *et al.*, 2001; Medana & Turner, 2006; Pierrot *et al.*, 2003; Riley *et al.*, 2010; Stevenson *et al.*, 2010).

Así, por ejemplo, la presencia de células mononucleares y leucocitos en vénulas del cerebro animal se ha demostrado también en la malaria cerebral de niños (Lou *et al.*, 2001). Por otro lado, tanto en pacientes humanos como en modelos murinos se han visto elevados niveles de citoquinas así como la activación y daño del endotelio (Carvalho, 2010; Lou *et al.*, 2001). Otro paralelismo es la acumulación de plaquetas en vasos sanguíneos cerebrales que se ha demostrado en niños (Lou *et al.*, 2001; White *et al.*, 2010). Además, la disminución del flujo sanguíneo, el aumento de lactato en sangre y la alteración de las propiedades de la barrera hematoencefálica se ha puesto de manifiesto tanto en el modelo murino como en la malaria cerebral humana (Carvalho, 2010; Hunt *et al.*, 2010; Lou *et al.*, 2001; Medana & Turner, 2006).

Sin embargo, la principal diferencia de este modelo experimental con respecto a la malaria cerebral humana parece ser el hecho de que los eritrocitos infectados se secuestran principalmente en los pulmones y en el tejido adiposo más que en el cerebro, donde se secuestran preferencialmente leucocitos y plaquetas (Franke-Fayard *et al.*, 2010; Franke-Fayard *et al.*, 2005; White *et al.*, 2010). Esto contrasta con otros estudios que demuestran que el modelo de *P. berghei* ANKA produce un secuestro de eritrocitos infectados en el cerebro (Amante *et al.*, 2007; Brian de Souza *et al.*, 2009; Jennings *et al.*, 1997), por lo que todavía se necesitan estudios más detallados sobre la cantidad de parásitos acumulados en el cerebro y otros órganos, así como a cerca de la naturaleza del secuestro en este modelo (Brian de Souza *et al.*, 2009; Franke-Fayard *et al.*, 2010).

Por otro lado, el receptor CD36, uno de los principales mediadores del secuestro de *P. falciparum* en órganos periféricos en el hombre, no parece mediar la adhesión de *P. berghei* ANKA en el cerebro, sino que media su adhesión principalmente en pulmones y tejido adiposo (Brian de Souza *et al.*, 2009; Franke-Fayard *et al.*, 2010; Franke-Fayard *et al.*, 2005). El hecho de que este receptor no

intervenga en el secuestro de glóbulos rojos infectados en el modelo murino no excluye que otros receptores puedan estar implicados en este fenómeno. Como sucede en humanos, se ha observado un aumento en la expresión de receptores como ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina en el endotelio vascular de cerebro en el modelo de malaria cerebral producido por *P. berghei* ANKA (Brian de Souza *et al.*, 2009). Sin embargo, se desconoce la proteína derivada del parásito que mediaría estas interacciones, ya que el genoma de *P. berghei* ANKA carece de genes homólogos a los genes *var* responsables de esta función en humanos (Franke-Fayard *et al.*, 2010) y tampoco se conoce la naturaleza de las interacciones entre *P. berghei* ANKA y las células endoteliales (Amante *et al.*, 2010).

La Tabla 3 resume distintas similitudes y diferencias existentes entre el modelo murino infectado con *P. berghei* ANKA y la malaria cerebral humana desarrollada por *Plasmodium falciparum*, lo que justifica que el modelo de ratones C57BL/6 infectado con esta especie de *Plasmodium* se utilice con frecuencia para el estudio experimental de la malaria cerebral.

Tabla 3.- Histopatología de la malaria cerebral en humanos y en el modelo murino de *P. berghei* ANKA*

CARACTERÍSTICAS COMUNES	HUMANOS	<i>P. berghei</i> ANKA
Hemorragia cerebral	++	++
Taponamiento de microvasos	++	++
Secuestro de plaquetas	++	++
Necrosis de microvasos	+	+
CAM inducidas	ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina, CD36, trombospondina	ICAM-1, VCAM-1, P-selectina
CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES	HUMANOS	<i>P. berghei</i> ANKA
Secuestro de eritrocitos infectados	+++	+
Formación de Knobs	++	-
Secuestro de leucocitos	++	+++

* Tomada y adaptada de (Brian de Souza *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2001).

A este respecto, la infección por *P. berghei* ANKA produce en ratones un síndrome neurológico que se manifiesta entre los días 6 y 14 post-infección con una mortalidad muy elevada, sin embargo, la parasitemia sanguínea en el momento de la muerte del animal es baja (Lou *et al.*, 2001). Un elevado porcentaje de los animales desarrolla síntomas de malaria cerebral entre el día 5 y 7 post-infección con bajos niveles de parasitemia sanguínea y la muerte les sobreviene en pocas horas o días más tarde (2-3).

Los síntomas neurológicos más frecuentes son erizamiento del pelo, hipotermia, ausencia de respuestas frente a estímulos, disminución de la movilidad, encorvamiento, debilidad, desviación de la cabeza, giros sobre sí mismos, ataxia, convulsiones, parálisis y coma. El tono muscular, la fuerza y la función autónoma (sobre todo la temperatura y tasa respiratoria) se ven afectados exclusivamente en animales con malaria cerebral (Amante *et al.*, 2007; Brian de Souza *et al.*, 2009; Carroll *et al.*, 2010; Jennings *et al.*, 1997; Lacerda-Queiroz *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2006; Lou *et al.*, 2001).

En los ratones C57BL/6 con 4-5 semanas de edad infectados con *P.berghei* ANKA la pérdida de peso es acelerada, desarrollan la patología de forma rápida y la mortalidad es muy elevada. En este modelo, de forma similar a lo que sucede en la malaria humana, la susceptibilidad a desarrollar malaria cerebral es dependiente de la edad del animal e inversamente proporcional a la misma (Adam *et al.*, 2003; Pierrot *et al.*, 2003). Además, los síntomas clínicos durante el curso de la malaria experimental murina varían entre individuos (Amante *et al.*, 2007; Bagot *et al.*, 2002; Brian de Souza *et al.*, 2009; Carroll *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2006; Vigario *et al.*, 2007), como sucede en la malaria cerebral humana (Brian de Souza *et al.*, 2009; Medana & Turner, 2006; Schofield & Grau, 2005; van der Heyde *et al.*, 2006). Por ello, resulta de especial interés su empleo para estudiar la fisiopatología de esta patología ya que, aunque se hayan observado algunas diferencias con la enfermedad humana, imita fielmente la sintomatología y susceptibilidad del hombre frente al desarrollo de la malaria cerebral.

3. OBJETIVOS/ OBJECTIVES

La malaria es todavía uno de los problemas sanitarios más importantes a nivel mundial debido a la alta morbilidad, mortalidad y al impacto socio-económico que ocasiona en la población humana, de la cual cerca de la mitad se encuentra en zonas con riesgo de transmisión. La mayor parte de esta mortalidad se produce en África debido a las complicaciones surgidas de la infección por *Plasmodium falciparum*, única especie capaz de ocasionar una de las formas más severas de la enfermedad: la malaria cerebral. Esta complicación neurológica es responsable de hasta el 80% de los casos fatales y afecta predominantemente a niños menores de cinco años. Aunque puede ser mortal en un 15-30% de los casos, la malaria cerebral es potencialmente reversible con un tratamiento adecuado. Sin embargo, más del 10% de los supervivientes presentan secuelas neurológicas que pueden llegar a ser muy graves pocos meses después de haber superado la enfermedad.

Aunque la patogénesis de la malaria cerebral ha sido ampliamente investigada, muchos de los aspectos celulares y moleculares de la misma aun no están completamente definidos. La complejidad multifactorial de este síndrome se relaciona con el secuestro de parásitos y la respuesta inmune del hospedador, como eventos principales, así como con otros mecanismos concomitantes. Esta complejidad ha sido puesta de manifiesto mediante observaciones clínicas y experimentales algunas de las cuales incluyen modelos animales. Las respuestas patofisiológicas que caracterizan la malaria cerebral se asocian con alteraciones en el metabolismo del cerebro que median, entre otros procesos, daño celular. Estos datos sugieren que daños ocasionados en regiones específicas del cerebro debido a la infección por *Plasmodium falciparum* podrían ser los responsables de las alteraciones neurológicas y las secuelas cognitivas observadas en esta complicación.

Por otro lado, la acción protectora que ejercen algunas moléculas antioxidantes frente al desarrollo de la malaria cerebral y sus secuelas cognitivas, indica, que el estrés oxidativo también está jugando un papel importante en la evolución de esta enfermedad. Sin embargo, aún se desconoce la implicación de marcadores específicos asociados a mecanismos de neuroprotección y plasticidad sináptica, así como el entorno de estrés oxidativo en el cerebro del hospedador durante el progreso de esta patología infecciosa. Por todo ello sería conveniente llevar a cabo estudios que puedan esclarecer los mecanismos implicados en los daños del sistema nervioso central que

aparecen en la forma cerebral de la malaria, como paso previo al desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas para prevenir esta fatal complicación.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, los **objetivos** propuestos en el presente trabajo fueron los siguientes:

1.- Estandarizar, en un modelo murino de malaria cerebral, un protocolo basado en el análisis del comportamiento de los animales que permita caracterizar e identificar de forma sistemática el fenotipo neurológico asociado al progreso de la enfermedad.

2.- Analizar el papel potencial que pudiesen tener factores neurotróficos y otros marcadores asociados a los mecanismos de plasticidad sináptica y supervivencia neuronal, en el desarrollo de las alteraciones neurológicas producidas en la malaria cerebral.

3.- Establecer el método oxiproteómico más adecuado para la detección e identificación de proteínas oxidadas en tejidos cerebrales.

4.- Caracterizar el entorno de estrés oxidativo en el cerebro del hospedador infectado y su implicación en el desarrollo del daño neurocognitivo asociado a la malaria cerebral.

The **aims** established for this study were:

- 1.- Standardize, in a murine model of cerebral malaria, a protocol based in animal neurobehaviour to establish the neurological phenotype associated to the disease progression.
- 2.- Analyze the potential role of neurotrophic factors and other biomarkers associated to synaptic plasticity and neuronal survival in the course of the neurological alterations produced in cerebral malaria.
- 3.- Establish the most suitable method for detection of protein oxidation and subsequent identification by mass spectrometry in cerebral tissues.
- 4.- Characterize the oxidative stress status in the infected host brain and its implication in the course of neurocognitive damage associated to cerebral malaria.

4. TRABAJOS EXPERIMENTALES

Declined expression of brain-derived neurotrophic factor correlates with neurological stages of cerebral malaria in mice

María Linares^{a,b,*}, Patricia Marín-García^{a,b,c,*}, Susana Pérez-Benavente^a, Jesús Sánchez-Nogueiro^d, Antonio Puyet^{a,b}, José M. Bautista^{a,b,‡}, and Amalia Diez^{a,b}

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.

^bInstituto de Investigación Hospital 12 de Octubre. Madrid.

^cDepartamento de Ciencias Morfológicas y Biomedicina, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Europea de Madrid, Campus de Villaviciosa de Odón, 28640, Madrid, Spain.

^dDepartamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.

*Both authors have contributed equally; ‡Corresponding Author

e-mails: marialinares@vet.ucm.es; patricia8149@bio.ucm.es; susipz@vet.ucm.es; nogueiro@vet.ucm.es; apuyet@vet.ucm.es; jmbau@vet.ucm.es; adiez@vet.ucm.es

Submitted to *PLOS One*

ABSTRACT

Neuronal damage is a key process in cerebral malaria (CM) infection and in the long-standing neurocognitive sequelae often observed in children after antimalarial treatment. Neurotrophic factors modulate the integrity of the central nervous system (CNS) including neuronal survival and synaptic plasticity. Here we report the brain distribution and expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) during the progression of experimental cerebral malaria in mice. As the severity of symptoms developed, mRNA expression of BDNF progressively decreased in several brain regions, most early in thalamus-hypothalamus, cerebellum, brainstem and cortex and correlated with a four-stage disease sequence. Immunohistochemical confocal microscopy revealed changes in the BDNF distribution pattern, suggesting altered axonal transport. Along CM progression, molecular markers of neurological infection and inflammation from the parasite and the host, respectively, were accompanied by a switch in the brain constitutive proteasome towards the induction of the immunoproteasome that impedes normal protein turnover and contributed to the BDNF abnormal distribution and its divergent expression at mRNA/protein levels. In parallel to the BDNF downregulation, the expression of neural cell adhesion molecule also diminished with increased CM severity. Together, these data point out to a role of BDNF in the pathogenesis of CM sequelae and suggest that rescue efficiency from CM might decrease with disease duration. Thus, BDNF could be a novel potential target for coadjuvant therapy to antimalarial treatment in CM.

INTRODUCTION

Cerebral malaria (CM) is the most important parasitic central nervous system (CNS) disease worldwide, accounting for 80% of all malaria fatal cases. Although CM could be lethal in 15-30% of the cases, is potentially reversible ^{1, 2}. Most patients that survive CM make a full recovery, though long-standing neurocognitive sequelae are often observed, particularly in African children. Post-CM impairment is associated with deficits in the areas of working memory, attention, language, hearing and vision and can attend with ataxia, hemiparesis or quadriparesis and epilepsy ³⁻⁵.

CM sequelae seem to be multifactorial although their causes are largely unknown. The microvascular obstruction by parasite adhesion and the exacerbated host inflammatory response seem to play a major role in triggering CM ⁶. A retrospective study has associated the severity of the clinical picture with axonal injury ⁷ and neuronal damage has arisen recently to be a key process in CM ⁸.

To this respect, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is emerging as an important regulator of synaptogenesis and synaptic plasticity underlying learning and memory in the adult CNS. Moreover, BDNF promotes the survival and differentiation of neurons, axon regeneration and it is involved in synaptic transmission ⁹⁻¹¹. Neuroprotection/neurotoxicity balance has been reported critical in CM development ¹² and damaged synaptic transmission is also observed in CM ¹³, suggesting that BDNF could play a major role in the CM syndrome.

Moreover, this central neurotrophin interacts with the proteasome system and the neural cell adhesion molecule (NCAM), both endorsed with significant roles in neuronal survival and synaptic plasticity ¹⁴⁻¹⁷. Altered levels of any of these molecules give rise to CNS and behavioral impairments ¹⁸⁻²¹. Host NCAM could also contribute to the sequestration of parasitized red blood cells (pRBC) eliciting CM since it is capable of *in vitro* interacting with pRBC ²², though its expression changes during CM progress has not yet been examined.

Because of the meaningful role of BDNF in several neurocognitive disorders²³, this neurotrophin was examined, in parallel with the proteasome and NCAM, during the disease progression of experimental CM (ECM) in mice. Here, a new approach of clustering the animals by their neurological outcome was used to avoid heterogeneity in disease onset and progress^{24, 25}. In addition, the physiological functions of the different brain regions were experimentally considered by independently analyzing them, since specific damage in any region could lead to recognizable neurological symptoms and sequelae^{13, 26, 27}.

In the present study we demonstrate that the brain-derived neurotrophic factor, the constitutive proteasome and the neural cell adhesion molecule diminish expression in *Plasmodium berghei*-infected mouse brain in a clinical severity dependent manner. Locally, inflammation markers as well as adhesion molecules precede the opening of parasite accumulation in the brain. Together with the finding that molecular markers studied in brain follow a 4-stage progress of cerebral malaria, our results demonstrate that neurological signs correlate with them.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

All experiments were conducted at the Universidad Complutense de Madrid in accordance with national and international guidelines for animal care, using protocols approved by the Animal Experimentation Committee at UCM. All efforts were made to minimize animal suffering.

Animals and experimental infection

Five-week old male C57BL/6 mice were purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain). All animals were pathogen-free and were kept in our facilities at the Complutense University of Madrid, with free access to food and water. Twenty four mice were intraperitoneally injected with 5×10^6 pRBC obtained from *P. berghei* (ANKA)-infected mice. Six uninfected mice served as controls.

Infection progress was monitored daily by staining blood smears with Wright's eosin methylene blue solution (Merck) followed by counting under the microscope. Neurological symptoms in the animals were also monitored daily including ruffled fur, abnormal gait, tremor, reduced grip strength, affected startle/touch response, abnormal visual response, reduced motility, head deviation, hemi- or paraplegia, tendency to roll over on stimulation, back elevation, ataxia and convulsions.

Infected animals were assigned to one of four disease stages (I-IV) depending on the severity of their neurological signs. At each stage, mice were sacrificed by cervical dislocation, decapitated and specimens obtained of peripheral tissue (lung, liver and kidney) and CNS tissue (olfactory bulb, frontal cortex, hippocampus, thalamus-hypothalamus, brainstem and cerebellum). To allow potential comparison of mice pRBC levels with human samples data, perfusion was not performed as recently suggested ²⁸.

RNA expression analysis

Total RNA was isolated from the olfactory bulb, hippocampus, frontal cortex, thalamus-hypothalamus, brainstem and cerebellum of control and CM mice using an ABI PRISM® 6100 Nucleic acid Prepstation following the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Reverse transcriptase reactions were performed using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). A 1:1 proportion of reverse transcriptase buffer to RNA was used.

Cell adhesion molecule, BDNF and cytokine mRNA levels were determined by quantitative reverse transcriptase-PCR. Relative abundances of these molecules were determined using the 5' fluorogenic nuclease assay (TaqMan) of the ABI 7700 Prism Sequence Detector system (Applied Biosystems). In separate PCR reactions, a commercial mixture of mouse specific primers and probes for intercellular adhesion molecule (*icam-1*), vascular cell adhesion molecule (*vcam-1*), *ncam*, *p-selectin*, *e-selectin*, *bdnf*, tumor necrosis factor- α (*tnf- α*), interferon- γ (*ifn- γ*), lymphotoxin- α (*lt- α*), immunoproteasome Psmb9 (*Imp2*) and Psmb8 (*Imp7*) subunits, proteasome Psmb1 (*β 1*) and Psmb5 (*β 5*) subunits and the housekeeping *β -actin* gene (TaqMan

MGB probes) were used. All PCR reactions were prepared with TaqMan PCR master Mix, No Amperase UNG (all from Applied Biosystems).

The specificity of the primers and probes used was verified by basic local alignment search tool (BLAST) analysis comparing the mouse genes selected to the *Plasmodium berghei* genome and no significant similarity was found. The β -actin gene served as an endogenous control to check for slight variations in the initial concentration, the total RNA quality and the conversion efficiency of the reverse transcription reaction. PCR reactions involved an initial incubation of 10 min at 95°C for polymerase activation, followed by 40 cycles (melting 15 s at 95°C, annealing and extension 1 min at 60°C) using an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Relative amounts of RNA were calculated by the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_T}$ method) ²⁹.

Western Blot Analysis

Total protein was extracted from brainstem and cerebellum of control and CM mice and 25 µg of each protein extract were separated in a 10% SDS-acrylamide gel and transferred to nitrocellulose transfer membranes (Protran, Whatman). Membranes were blocked in a 5% milk phosphate buffer saline (PBS)-Tween 0.05% solution and probed with antibodies against BDNF (1/200, Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. Membranes were then washed with PBS-tween solution, incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit-Ig secondary antibody (1/2000, GE Healthcare), reacted in SuperSignal solution (Pierce) for 5 min, and exposed to a medical x-Ray film (Agfa). Densitometry of blots was performed using the Quantity-One 1-D analysis software (Bio-Rad).

The housekeeping used to normalize the data was chosen after analyze the specificity of several antibodies (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH), 1/4000, Applied Biosystems; α -Tubulin, 1/10000, Sigma-Aldrich; β -Actin, 1/5000, Sigma-Aldrich) by comparing their reactivity with 9 µg of a mouse or *Plasmodium berghei* protein extract.

Immunofluorescence assays

Control and infected mice were sacrificed and whole brains removed and fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde in PBS (w/v). After fixation, brain was submitted to a cryoprotective process. Sections of 10 µm were made using a Leica 3050 M cryostat. Brain sections were incubated using the following primary antibodies: polyclonal antibody rabbit anti-BDNF at 1:25 dilution from Santa Cruz Biotechnology and monoclonal mouse anti-β-tubulin at 1:500 dilution from Sigma. Subsequently, the brain sections were washed with PBS buffer and incubated with secondary antibodies at the following dilutions: goat anti-rabbit IgG labeled with Indocarbocyanine, Cy3, (Jackson Immunoresearch Laboratories) (1:400) and goat anti-mouse IgG labeled with Alexa Fluor 488 from Invitrogen (1:400). Finally, the brain sections were washed with PBS, stained with 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI), washed with PBS and mounted following the standard procedures. Controls were carried out by following the same procedures but the primary antibody was substituted by the same volume of PBS. Both markers were analyzed by confocal microscopy taking successive Alexa Fluor and Cy3 fluorescent images using a Leica CTR 6500 fluorescence microscope (Leica Microsystems). Alexa Fluor was monitored by excitation with the 488-nm wavelength laser, Cy3 was excited at 561-nm wavelength and DAPI was excited at 405-nm wavelength. To evaluate correlation between BDNF, α-tubulin and DAPI distribution pattern, Pearson analysis was performed using the LAS-AF Lite software (Leica Microsystems).

Quantifying tissue infection levels by quantitative PCR

Tissue parasite loads are expressed as the number of pRBC per milligram of host tissue and were determined by quantitative PCR as previously described ¹³. Briefly, genomic DNA from the different peripheral tissue and brain regions was isolated using TransPrep chemistry in the ABI PRISM® 6100 Nucleic acid Prepstation, following the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). Parasite and host DNA quantification was conducted by quantitative PCR, amplifying *P. berghei* (ANKA) 18S and mouse β-actin genes in the same DNA sample in separate tubes using specific pairs of primers designed in our laboratory ¹³ and using the Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Amplification, data acquisition and

data analysis were carried out using the ABI 7700 Prism Sequence Detector system. The amplification conditions were 20 s at 95°C for enzyme activation and 40 cycles of 10 s at 95°C and 30 s at 60°C.

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm standard error. Statistical analyses were performed using the SPSS 15.0 statistics package. The non-parametric tests U-Mann Whitney and Kruskal-Wallis were used to compare two groups or more than two groups respectively. Statistical analyses were performed independently for each molecule and brain region. Differences between means were considered significant when the p value was < 0.05 .

RESULTS

Neurological progression of CM in mice

Since, for obvious reasons, time-course studies during CM infection cannot be conducted in humans, the use of ECM models becomes necessary. Although ECM might not reproduce all the features of human disease, models, such as infection of C56BL6/mice with *Plasmodium berghei* ANKA, are commonly used since they recapitulate most of features of human CM ^{28, 30-34}. Most investigations define the severity or disease in terms of the number of days post infection ^{12, 35, 36}. However, in view of the heterogeneity observed in disease onset ^{24, 25, 28}, we classified the animals accordingly to neurological outcome.

In our study, infection levels and CM progression were assessed daily in individual mice by quantifying peripheral blood parasitemia and recording characteristic clinical symptoms of this syndrome. ECM mice showed progressive clinical changes, starting with early symptoms and later developing more specific neurological signs. Finally, animals lapsed into the most severe symptoms (Figure 1 and Movie 1).

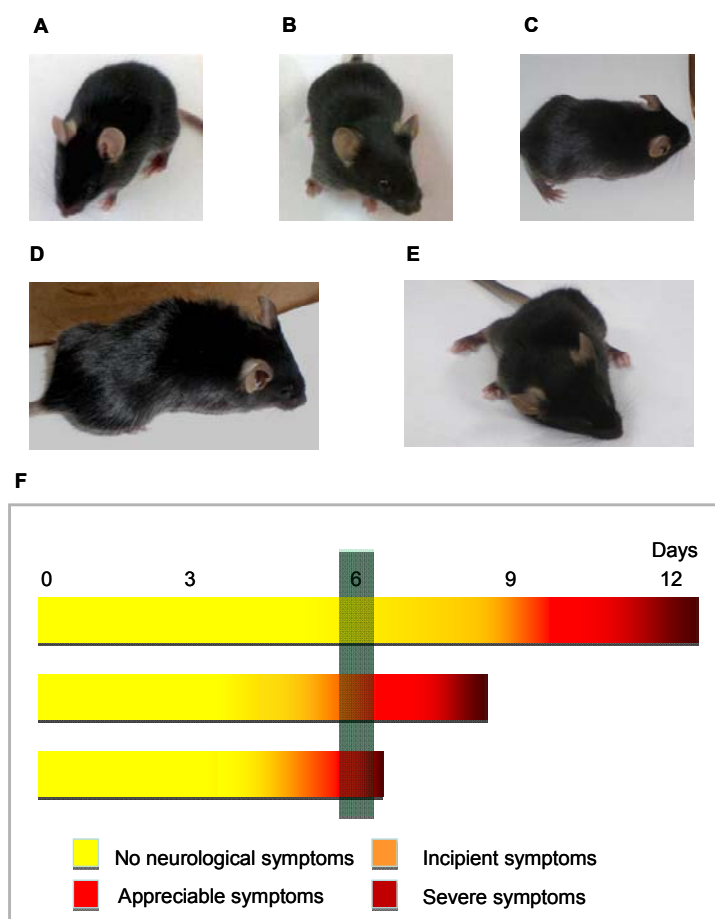


Figure 1.- Definition of the neurological stages of ECM. A, controls. B, mice with no neurological signs at stage I. C, mice with incipient neurological symptoms at stage II (head deviation or hemi-paralysis). D, remarkable neurological symptoms observed in animals at stage III. E, neurological symptoms worsen at stage IV and include severe paralysis. F, clinical heterogeneity in the CM progression of three representative mice (horizontal bars) within an experimental group. Vertical green bar illustrates heterogeneity at a given time (e.g. day 6).

Stage I was defined as producing no neurological manifestations in the first few days of infection. Animals at this stage were neurologically indistinguishable from controls, although they presented parasitemia (Figure 1B and 1A respectively, Movie 1). Stage II was defined as the incipient symptoms of CM: head deviation or hemi-paralysis (Figure 1C). Some of these animals also presented ruffled fur, altered motility, weakness, tremor, rollover reaction and anemia. From this stage, symptoms worsened rapidly. At stage III, neurological manifestations were appreciable: head deviation and or hemi-paralysed/paralysed, motionless, weakness and ruffled fur (Figure 1D). Finally, the most severe symptoms were observed in stage IV and included severe head deviation, acute hemi-paralysis/paralysis, motionless, intense weakness and ruffled fur (Figure 1E). Some animals assigned to stages III and IV also presented anemia, pelvic elevation, no

response upon stimulation and tremor. Neurological outcome at each stage was also denoted by the contingency response and spatial orientation displayed upon swimming (Movie 1, right frame).

It should be emphasized that, individually, ECM mice did not present the same symptoms at the same time (Figure 1F). Although initial symptoms were observed from day 6 as previously reported ³¹, temporal heterogeneity was observed in the appearance of stage II. Most severe stages (stages III and IV) were most often observed within 6-30 h after the first neurological symptoms appeared (stage II).

BDNF expression pattern during the time-course of ECM

bdnf mRNA levels were determined during the course of cerebral malaria in the main brain regions (olfactory bulb, hippocampus, frontal cortex, thalamus-hypothalamus, brainstem and cerebellum). *bdnf* was significantly and steadily downregulated until stage IV in all the cerebral regions examined (ranging from 2 to 7 fold depending on the cerebral region), being thalamus-hypothalamus, cerebellum, brainstem and cortex the most affected areas (Figure 2). The observed downregulation inversely correlated with the increased neurological outcome of infection.

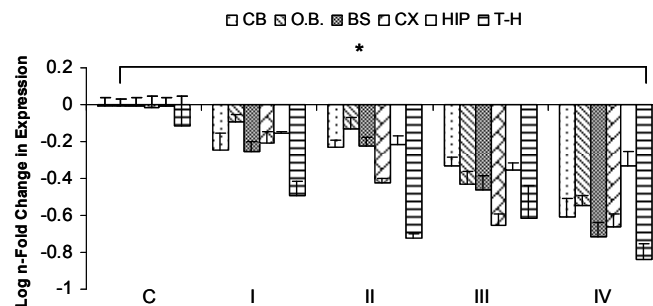


Figure 2.- Brain mRNA expression of *bdnf*. N-fold changes in the expression of *bdnf* mRNA in the different brain regions: cerebellum (CB), olfactory bulb (O.B.), brainstem (BS), frontal cortex (CX), hippocampus (HIP) and thalamus-hypothalamus (T-H) of control mice (C) and mice at different CM stages (I-IV). Data are the mean \pm standard error of determinations in 5-7 animals. N-fold change was calculated by the quotient between mRNA amount of each mouse vs. mRNA mean amount of control mouse. *P* values for comparisons in O.B., BS, CX, *P*<0.001 and CB, HIP, T-H, *P*<0.005. **P*<0.005.

These results suggested determining BDNF expression also at protein level. Care was taken to avoid antibody cross-reactivity between *Plasmodium* and mouse housekeeping proteins used to normalize the data. Antibodies against mouse GADPH, α -tubulin and β -actin were tested with a *P. berghei* protein extract and only anti-mouse GADPH did not show any band at the expected size (Figure 3A) and consequently it was the housekeeping protein used for analysis of protein expression. BDNF expression at protein level revealed no significant changes between control and cerebral malaria stage IV (Figure 3B).

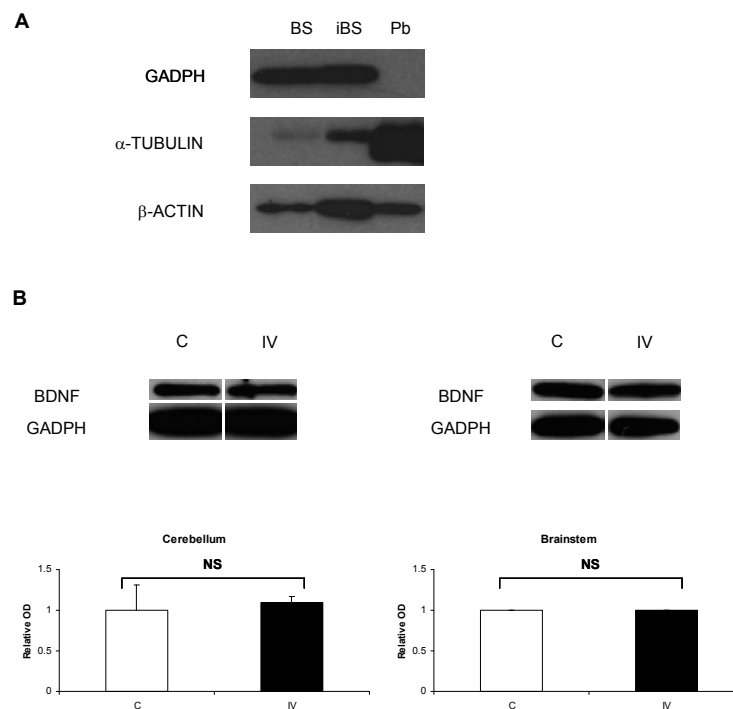


Figure 3.- Protein expression of BDNF. *P. berghei* cross-reactivity of the antibodies against several murine housekeeping genes (A): Western blot showing GADPH, α -Tubulin and β -Actin immunoreactivity at the expected size of protein extracts from brainstem (BS), infected brainstem (iBS) and blood isolated *P. berghei* (Pb). BDNF protein expression analysis (B): Western blot and densitometry analysis to determine BDNF and GADPH protein content in cerebellum and brainstem of control (C) and stage IV-CM (IV) mice. Relative optical density (OD) values given are the mean \pm standard error in 4 different animals, calculated as normalized expression of BDNF in each mouse relative to the mean value of control mice. NS, not significant.

Then, we conducted immunohistochemical analyses to compare BDNF distribution pattern between control and CM mice at the most severe stage of the disease (stage IV).

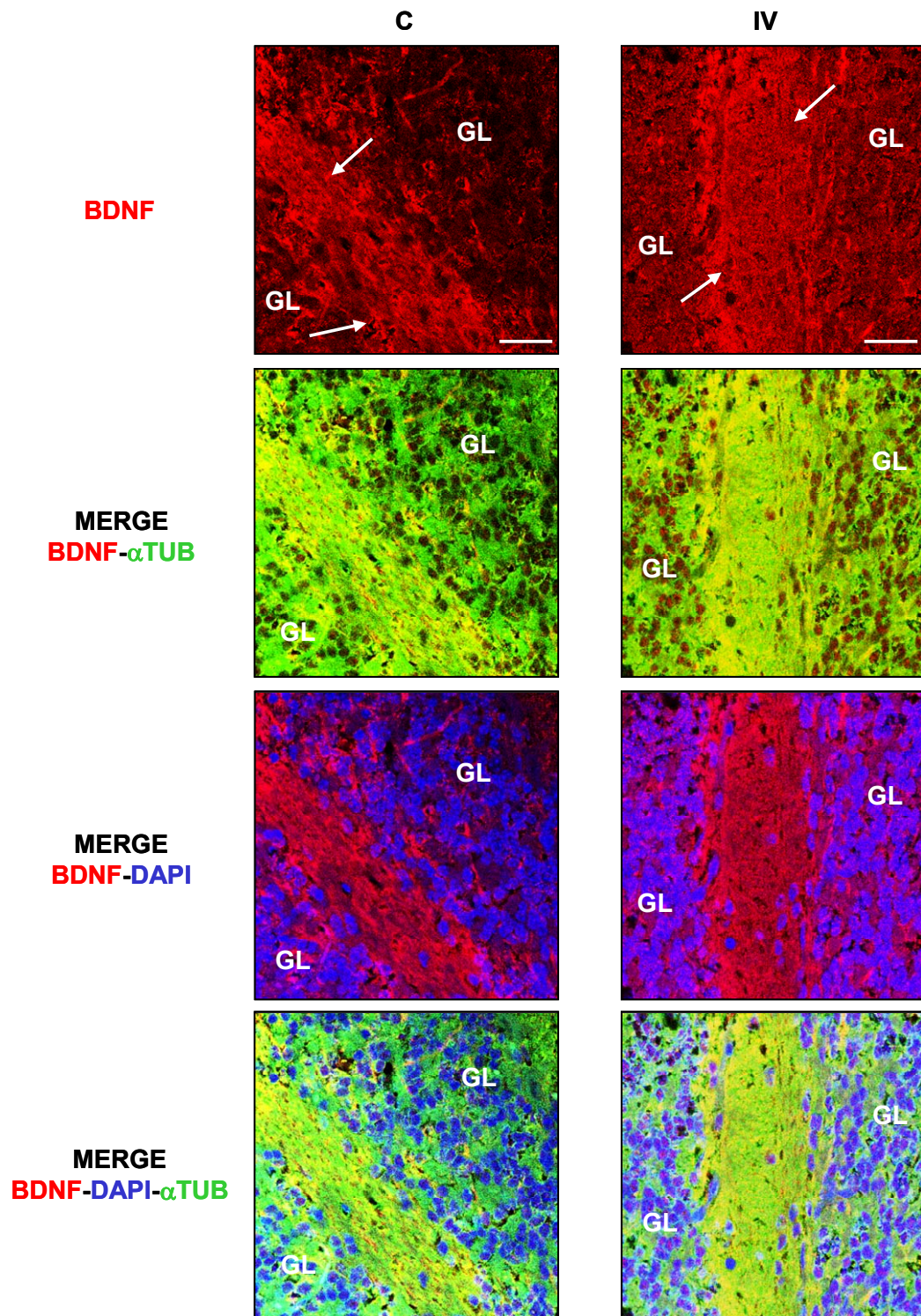


Figure 4.- BDNF distribution in brain. Immunohistochemical distribution profiles of BDNF in brain slices obtained from control (C) and CM mice at stage IV (IV). Images show the co-localization between BDNF (red), DAPI (blue) and α -Tubulin (green) in the cerebellum. Arrows point axodendritic fibers. Granule layer, GL. Scale bar: 25 μ m.

BDNF was detected in all analyzed regions. BDNF signal intensity was particularly high in cerebellum and preferentially located at the axodendritic fibers of granule neurons in both control and CM mice (Figure 4). A significant higher co-localization signal of BDNF and DAPI ($P < 0.05$) was observed in infected mice (Pearson's correlation = -0.13 ± 0.03) vs. control mice (Pearson's correlation = -0.21 ± 0.02). On the contrary, control animals showed a higher co-localization signal of BDNF and α -Tubulin ($P < 0.005$) in control mice (Pearson's correlation = 0.52 ± 0.02) vs. infected mice (Pearson's correlation = 0.41 ± 0.02).

Proteasome and immunoproteasome subunits expression switching

BDNF could interact with the proteasome system in such a way that proteasome inhibition blocks transcription of neurotrophins including *bdnf*¹⁴. Furthermore, diminished proteasome expression drives to the accumulation of misfolded proteins³⁷, which may mask *bdnf* downregulation at protein level.

On the other hand, inflammation generated by infectious diseases increases the expression of the immunoproteasome subunits inducing the switching from the constitutive proteasome, involved in the normal protein processing through the ubiquitin system, to the immunoproteasome complex, specialized in processing polypeptides for antigen presentation³⁸, leading to the accumulation of misfolded proteins. To investigate switching from proteasome to immunoproteasome during CM progression, mRNA levels of the proteasome subunits $\beta 1$ and $\beta 5$ and their replacing immunoproteasome subunits *lmp2* and *lmp7* were analyzed.

Early at the asymptomatic stage I the immunoproteasome subunits *lmp2* and *lmp7* were 10-fold significantly upregulated in all brain areas, but more remarkable in cerebellum (Figure 5), persisting along the CM progression. Conversely, the constitutive proteasome subunits $\beta 1$ and $\beta 5$ were gradually downregulated (approx. from 2- to 6-fold, depending on the cerebral region and stage) and cerebellum and brainstem showed the most decreased values (Figure 5). This progressive downregulation of proteasome subunits $\beta 1$ and $\beta 5$ correlated with the mRNA expression of *bdnf* and with the increased neurological signs in ECM mice.

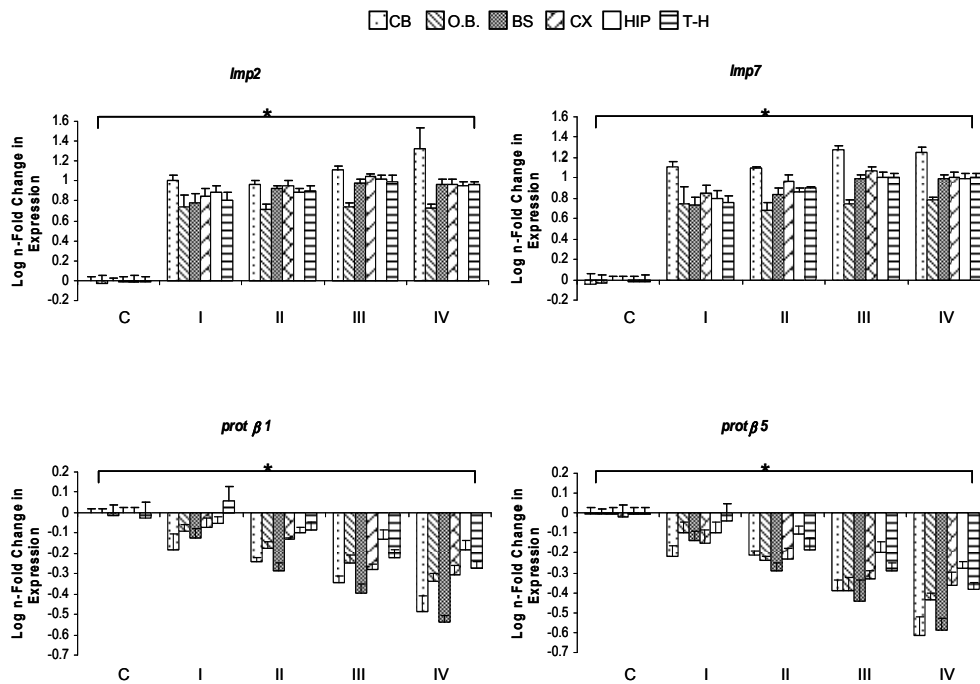


Figure 5.- Brain mRNA expression of proteasome and immunoproteasome. N-fold changes in the expression of mRNA of the immunoproteasome subunits *lmp2* and *lmp7* and the proteasome subunits $\beta 1$ (*prot $\beta 1$*) and $\beta 5$ (*prot $\beta 5$*) in the cerebellum (CB), olfactory bulb (O.B.), brainstem (BS), frontal cortex (CX), hippocampus (HIP) and thalamus-hypothalamus (T-H) of control mice (C) and mice at different disease stages (I-IV). Data are the mean \pm standard error of determinations in 5-7 animals. N-fold change for each subunit was calculated by the quotient between mRNA amount of each mouse vs. mRNA mean amount of control mouse. *P* values for comparisons of *prot $\beta 1$* : in CB, O.B., BS, CX, *P*<0.001; T-H, *P*<0.005; HIP, *P*<0.05; *prot $\beta 5$* : CB, O.B., T-H, *P*<0.001; BS, CX, HIP, *P*<0.005; *lmp2*: CB, BS, CX, HIP, TAL, *P*<0.005; O.B., *P*<0.01; *lmp7*: BS, T-H, *P*<0.001; CB, O.B., CX, HIP, *P*<0.005. **P*<0.05.

Early pro-inflammatory cytokine expression changes in the brain

Overall, IFN- γ , TNF- α and LT- α are pro-inflammatory cytokines accepted to participate in the pathogenesis of CM^{31, 39-42}. Moreover, IFN- γ and TNF- α have also been reported to increase the expression of the immunoproteasome subunits⁴³. To determine potential association of proteasome switching and local inflammation, mRNA expression of these three cytokines was examined in the different brain areas at clinical stage I, when the expression of the immunoproteasome subunits utterly changed. At this asymptomatic stage, all brain areas exhibited almost identical cytokine mRNA expression pattern. Thus, with respect to the control mice, *ifn- γ* and *tnf- α* significantly increased between 10- and 20-fold and *lt- α* maintained identical expression values (Figure 6). The *ifn- γ* gene was the most upregulated, showing around double the level of *tnf- α* in the cortex, hippocampus, thalamus-hypothalamus and brainstem.

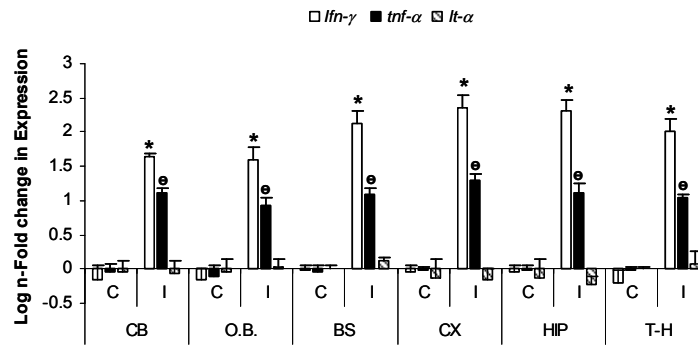


Figure 6.- Brain mRNA expression of cytokines. mRNA expression levels of cytokines in the different brain regions. N-fold changes in mRNA expression for *ifn-γ*, *tnfr-α* and *It-α* in the cerebellum (CB), olfactory bulb (O.B.), brainstem (BS), frontal cortex (CX), hippocampus (HIP) and thalamus-hypothalamus (T-H) of control mice (C) and mice in stage I (I). Data are the mean \pm standard error of determinations in 3-6 animals. N-fold change for each cytokine was calculated by the quotient between mRNA amount of each mouse vs. mRNA mean amount of control mouse. Minor expression levels of *It-α* were detected that did not differ between the C and CM mice. * indicates a significant difference in *ifn-γ* expression; ° indicates a significant difference in *tnfr-α* expression. *, ° $P < 0.01$.

NCAM expression pattern and brain parasite load during ECM progression

NCAM is a cell-surface glycoprotein member of the immunoglobulin superfamily that plays key roles in normal brain development, including axonal/dendritic growth, branching and synaptic plasticity ⁴⁴. NCAM has been reported to interact with BDNF to mediate neuronal survival and plasticity ^{15, 16, 45}. The *in vitro* ability of this adhesion molecule to adhere pRBC ²² suggests that it might be also involved in cytoadherence. Nevertheless, NCAM induction and potential role in cytoadherence events or brain dysfunction during CM progress has not yet been examined. Cytoadherence is a specific CM outcome that consists in preferentially localize pRBC in the deep vascular beds of body organs (mainly brain) and prevents its removal by the spleen ². The upregulation of other inducible adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin in CM brains ^{1, 28, 46} suggests a composite attendance of elements interacting in pRBC adhesion to blood vessels ^{1, 47}. However there is no consensus on the sequence and timing of cytoadherence events in CM ^{28, 48}. Hence, to investigate NCAM in association with the other known cytoadherence players, mRNA expression levels of *ncam*, *icam-1*, *vcam-1*, *p-selectin* and *e-selectin* in parallel to parasite load were determined during the course of infection in the CNS.

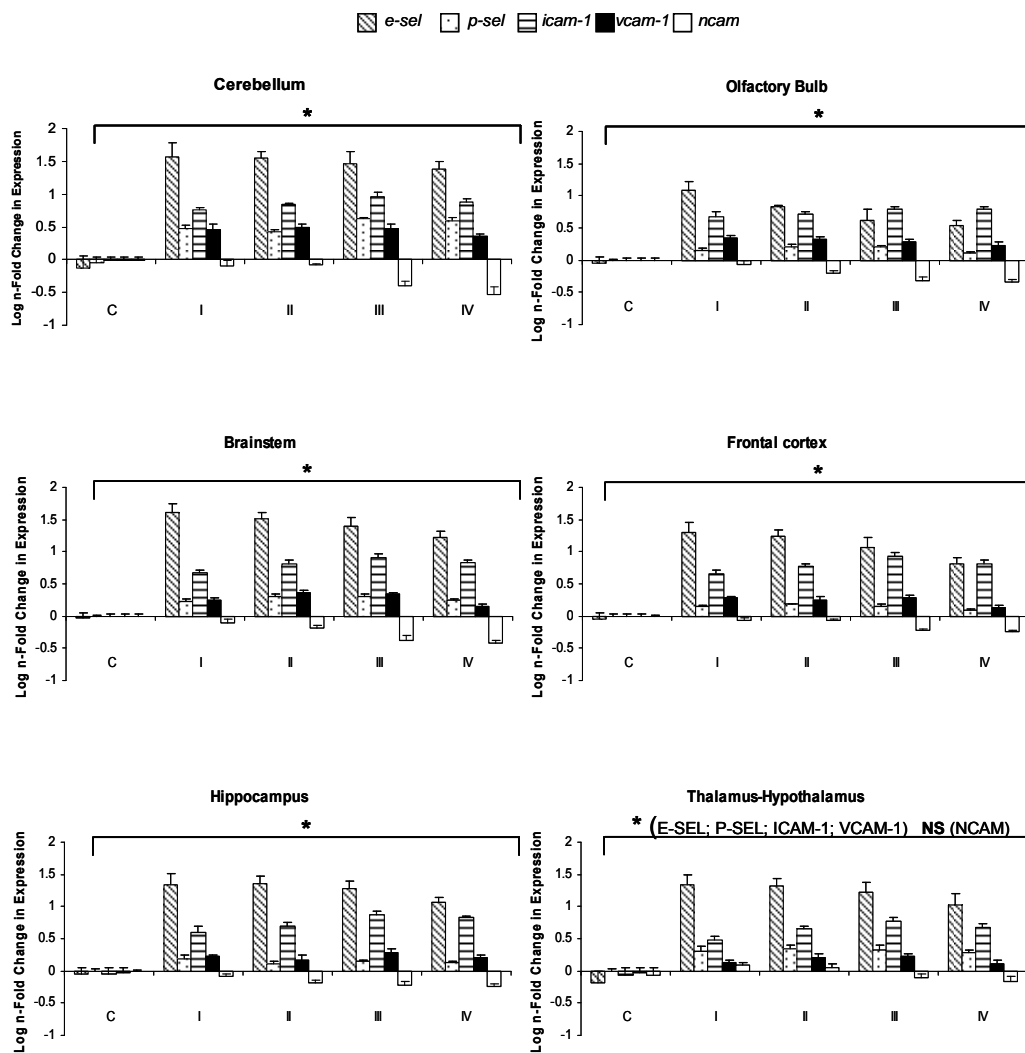


Figure 7.- Brain mRNA expression of adhesion molecules. N-fold changes in the expression of mRNA for *e-selectin* (*e-sel*), *p-selectin* (*p-sel*), *icam-1*, *vcam-1* and *ncam* adhesion molecules in the cerebellum, olfactory bulb, brainstem, frontal cortex, hippocampus and thalamus-hypothalamus of control mice (C) and mice at different CM disease stages (I-IV). Data are the mean \pm standard error of determinations in 5-7 animals. N-fold change for each adhesion molecule was calculated by the quotient between mRNA amount of each mouse vs. mRNA mean amount of control mouse. *P* values for comparisons in the cerebellum: *icam-1*, *p-sel*, $P < 0.001$; *vcam-1*, *ncam*, $P < 0.005$; *E-SEL*, $P < 0.01$; olfactory bulb: *e-sel*, $P < 0.001$; *icam-1*, *vcam-1*, *p-sel*, *ncam*, $P < 0.005$; brainstem: *icam-1*, *vcam-1*, $P < 0.001$; *e-sel*, *p-sel*, *ncam*, $P < 0.005$; frontal cortex: *icam-1*, *ncam*, $P < 0.001$; *vcam-1*, *e-sel*, $P < 0.005$; *p-sel*, $P < 0.01$; hippocampus: *icam-1*, $P < 0.001$; *e-sel*, $P < 0.005$; *ncam*, $P < 0.01$; *vcam-1*, *p-sel*, $P < 0.05$; thalamus-hypothalamus: *icam-1*, $P < 0.001$; *e-sel*, $P < 0.005$; *p-sel*, $P < 0.01$; *vcam-1*, $P < 0.05$. * $P < 0.05$; NS, not significant.

In infected mice, each adhesion molecule exhibited a similar expression pattern in all the brain areas (Figure 7). As expected, the expression of *e-selectin*, *p-selectin*, *icam-1* and *vcam-1* was significantly upregulated during CM progression. This event was observed early from asymptomatic stage I in all brain areas, most remarkable in cerebellum and brainstem (Figure 7). Upregulation of these molecules persisted along all neurological stages (stages II-IV).

The order of adhesion molecule expression upregulation levels was *e-selectin* > *icam-1* > *p-selectin* ~ *vcam-1*, and the maximum increase observed from baseline levels were 40-, 10-, 5- and 4-fold respectively, depending on cerebral region and disease stage. Conversely, in the brain areas examined, *ncam* was significantly downregulated predominantly in stages III and IV (from 2- to 4-fold, depending on the cerebral region), and again its downregulation was especially noticeable in the cerebellum and brainstem (Figure 7).

Data available in the literature revealing pRBC accumulation in brain and peripheral tissues in ECM in mouse have also raised debate on their pathophysiological relevance^{2, 49-51}. Hence to compare pRBC accumulation during ECM progression in brain regions and peripheral tissues (including liver, lung and kidney) accurate parasite load was determined by quantitative PCR.

Peripheral blood samples obtained from the ECM mice on the day of sacrifice according to the clinical stage (Figure 8A) revealed a low parasitemia level during the course of infection. Although parasitemia increased significantly from controls to stage IV ($P < 0.001$), the largest rise between neurological stages was produced from stages I to II (two-fold) and no significant differences were observed from stages II to IV, which is the time-period when the most severe symptoms develop.

Parasite loads detected by quantitative PCR in peripheral tissues behaved similarly, including liver, lung and kidney (C-IV in lung, $P < 0.005$; in liver and kidney, $P < 0.001$). In these tissues, parasite loads failed to vary significantly once neurological symptoms appeared (Figure 8B) unlike the behaviour observed in the different cerebral regions (Figure 8C).

Thus, during the course of ECM, parasite loads increased in all brain regions (C-IV in all regions except thalamus-hypothalamus, $P < 0.001$; thalamus-hypothalamus, $P < 0.05$). In most brain areas, the build up of parasites was detected from stage II onwards, and increases were significant in the cerebellum ($P < 0.05$), brainstem ($P < 0.05$) and olfactory bulbs ($P < 0.05$). Greatest accumulations of the parasite were observed at stage III (in the cerebellum, brainstem and thalamus-

hypothalamus) or IV (in the olfactory bulbs and cortex) depending on cerebral region. The highest numbers of pRBC per milligram of tissue were detected in the cerebellum (161,1 \pm 31,9) and brainstem (196,2 \pm 70,9) at stage III. The significant parasite accumulation, observed from stage II and thereafter, correlated with the appearance of the most prominent neurological symptoms and therefore with the neurological outcome of infection, inversely to the declined BDNF expression. Remarkably, comparison of absolute amounts of parasite load (pBRC/mg) showed up to 10 fold higher values in peripheral tissues than in brain (Figure 8).

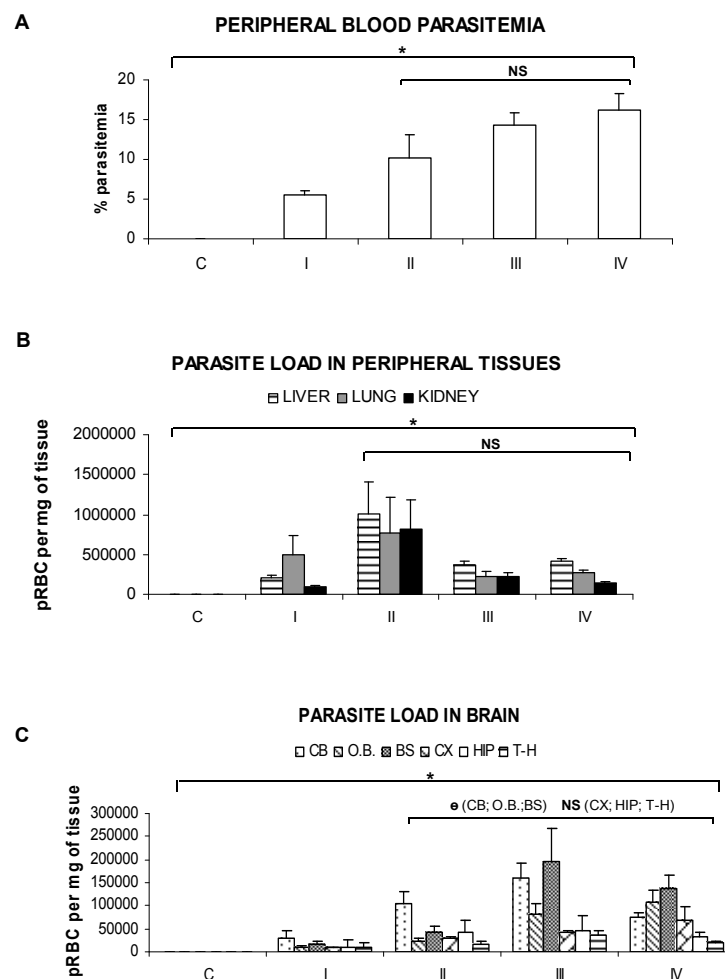


Figure 8.- Parasite accumulation in brain, blood and peripheral tissues. Parasite load quantification in peripheral blood (A), peripheral tissue (B) and brain tissue (C) during CM progression. Brain areas analyzed: cerebellum (CB), olfactory bulb (O.B.), brainstem (BS), frontal cortex (CX), hippocampus (HIP) and thalamus-hypothalamus (T-H). Data are the mean \pm standard error of determinations in 4-6 animals. pRBC, infected red blood cells. C, control mice; I, stage I; II, stage II; III, stage III, IV, stage IV. * indicates a significant difference between groups C-IV; θ indicates a significant difference between groups II-IV. *, θ $P < 0.05$; NS, not significant.

DISCUSSION

Neurological sequelae are frequently observed in African children who survive CM ^{4, 5}. Since BDNF is critical for neuronal survival, synaptic plasticity and cognitive processes ⁵²⁻⁵⁴, BDNF expression was analyzed in this study within a new approach of clustering ECM animals by their neurological outcome. At mRNA level, a gradual decrease of *bdnf* expression was observed in parallel with the progression of neurological symptoms. *bdnf* downregulation could be responsible of altered pathways modulating cell survival, proliferation and differentiation in brain. BDNF expression is critical for survival after injury ⁵⁵ and for axon regeneration ¹⁰. Detailed studies of CM in human and mouse reveal an array of neurological alterations including axonal injury and loss of endothelial cells and neurons ^{7, 27, 56}. Since *bdnf* transcription rely upon neuronal activity ¹¹, the lost of neurons in CM could mediate the observed *bdnf* downregulation. Furthermore, the role of BDNF in vascular endothelium organization ⁵⁷ suggest also that it diminished expression might be associated to the blood-brain barrier modifications produced during CM progression ³².

Moreover, mice at the most severe stage of the disease showed a differential pattern of BDNF distribution, which suggests that the transport system to the axodendritic fibers is disrupted. This is in agreement with the axonal transport modifications observed in human CM ⁵⁸. Although, changes of BDNF at protein level were not observed, a plausible explanation is the observed downregulation of the proteasome subunits $\beta 1$ and $\beta 5$, delaying protein turnover via the ubiquitin-proteasome pathway ⁵⁹. The downregulation of other key molecules involved in the ubiquitin-proteasome pathway, such as the ubiquitin ligase complex, which mediates the polyubiquitination of misfolded proteins has been recently observed in CM ⁶⁰. The hijacking of the constitutive proteasome by induction of the immunoproteasome is an inflammatory response in brain to human immunodeficiency virus infection that impedes normal protein turnover ³⁸. TNF- α and IFN- γ are main inducers of the proteasome immunosubunits ⁴³ and thus, the early mRNA upregulation of these two pro-inflammatory cytokines observed in our model before any neurological symptoms in infected mice suggest that inflammation could play a major role in the proteasome switching described here.

The proteasome also participates in neuronal survival and plasticity ^{14, 37, 61-63} and its dysfunction contribute to neurocognitive disturbances as a consequence of the altered protein turnover that interferes synaptic function ^{18, 38}. Thus, the association of BDNF transcriptional blockade with proteasome inhibition reported also in diverse neurological malfunctioning ^{14, 17} can also be responsible for the accelerated neurological deterioration during the progress of ECM in mouse. Furthermore, spatial memory training upregulates the constitutive proteasome subunits and downregulates the inducible ones ⁶¹ suggesting that the inflammatory induction of the immunoproteasome in CM underlies, at least in part, the cognitive impairment sequelae as a consequence of protein aggregation. This is in agreement with the observation that TNF- α and INF- γ have inhibitory effects in brain protection and synaptic plasticity ^{64, 65}.

In our model, the expression of *ncam* was downregulated with increasing CM severity. NCAM plays a key role in neural development, cell migration, differentiation, survival, synaptogenesis, synaptic stabilization, and neuroplasticity ^{16, 66}. In addition, NCAM contributes to functional recovery and survival after injury ^{15, 16} and it is involved in learning and memory ^{15, 45, 66}, interacting with BDNF to mediate neuronal survival and plasticity ^{15, 16, 45, 67}. Interfering with NCAM functions lead to cognitive impairment, learning deficits, including spatial learning, memory and emotional alterations ^{15, 66}, which could explain the memory and language complications observed in children who recover from CM ^{49, 68}.

In vitro studies suggest that NCAM might participate in pRBC adhesion ²². However, in our *in vivo* model, the mRNA downregulation of *ncam* contrast with the early upregulation of *icam-1*, *vcam-1*, *e-selectin* and *p-selectin* along the ECM progress and brain parasitemia accumulation suggesting that NCAM is unlikely to collaborate in pRBC adhesion to the vascular endothelium in brain. In addition, the upregulated adhesion molecules seem to be early required for subsequent brain sequestration of pRBC, confirming previously reported findings ^{1, 28, 46, 69}. The pRBC sequestration in the brain of mice showing neurological signs of CM observed by us and other authors ^{26, 28, 35, 40, 49, 50, 70} contrasts with another study in which the build up of pRBC was only detected in peripheral tissues ⁵¹. Whole body imaging and multi-organ comparisons could under-estimate pRBC accumulation since the signal from

pRBC is likely to be much lower in the brain than in highly vascularised organs, where we also detected the largest parasite amounts but not their progressive increase.

According to our results, the inflammatory TNF- α and IFN- γ response seems to elicit pRBC accumulation by upregulating expression of *icam-1*, *vcam-1*, *e-selectin* and *p-selectin* ^{1, 31, 35, 42, 46, 47, 71-73}. Moreover, the early involvement of local cytokines could explain why blocking antibody therapy against cytokines is able to prevent but not reverse ECM ²⁸. Conversely, although a major role in *icam-1* upregulation has been advocated for LT- α , this cytokine does not appear to mediate the early upregulation of adhesion molecules in our 4-stage neurological model. Hence, the reported high levels of LT- α in the last stage of ECM ^{30, 40} could be the consequence of later brain alterations.

In our four-stage ECM model, major alterations were observed in cerebellum and brainstem, as previously reported ^{26, 27, 74}, which is in agreement with the neurological symptoms of CM including ataxia and impairment of movement and balance ^{27, 68}. Cerebellum is also one of the brain regions with highest basal BDNF expression and is a key region responsible for cognitive functions ⁹. Furthermore, the greatest parasite accumulation during ECM was detected in cerebellum, as reported elsewhere ^{13, 35, 75}. Since human CM shows also a peak expression of adhesion molecules in cerebellar sections ¹ this region emerges as the most importantly damage in both human and mouse CM.

In conclusion, early changes detected in neuroinflammation and later changes in neuroplasticity mediators in parallel with pRBC sequestration in CM mice (Fig. 9) might suggest the existence of a critical point of non-return for the neurocognitive deterioration observed in recovered patients. Early treatment may provide a way to reduce cognitive sequelae in children surviving CM. As BDNF administration exerts substantial protective effects preventing cell death and reduces the neuronal signs of several CNS diseases ²³, it can be a prospective therapeutic agent to modify or reverse the neurodegenerative process in CM. To this respect, glatiramer acetate, a compound that augments the expression of BDNF in mice ⁷⁶, has been demonstrated to reduce the risk for developing ECM ⁷⁷.

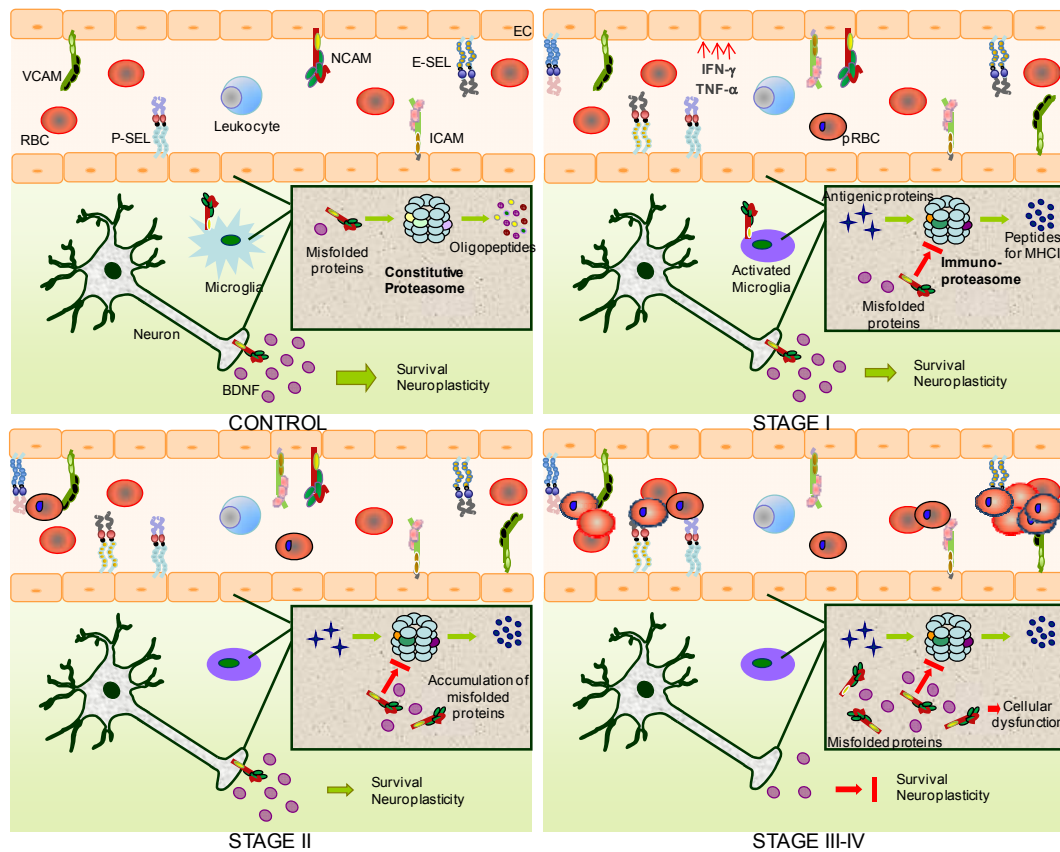


Figure 9.- Physiopathological markers of ECM progression. The cartoon summarizes events hypothetically connected along the 4-stages of ECM. The early inflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ trigger pRBC accumulation by modulating the expression of ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and P-selectin. Expression switching from constitutive to immune subunits of the proteasome promotes accumulation of misfolded proteins. Finally, BDNF, NCAM and proteasome downregulation impair neural cell survival and neuroplasticity. E-SEL: E-selectin; P-SEL: P-selectin; EC: endothelial cell; RBC: red blood cell.

SUPPORTING INFORMATION

Movie 1 (Available in the CD)

Definition of the four neurological stages of ECM. Animals at stage I are neurologically indistinguishable from controls. At stage II animals present incipient head deviation or hemi-paralysis. These symptoms worsen at stage III, when these neurological symptoms are more appreciable, including head deviation and/or paralysis, motionless, weakness and ruffled fur. At stage IV, animals acquire the most severe symptoms: severe head deviation, acute paralysis, motionless, intense weakness and ruffled fur. Finally, animals develop coma and later die.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by grants BIO2007-67885 and BIO2010-17039 from the Spanish Ministry of Science and Innovation and by the Program of Consolidated Research Teams from UCM-Comunidad de Madrid (Research Team 920267). M. L. holds a research FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (AP20061576). We thank Dr. Ruth Gil Prieto (URJ) for statistical assistance, Ana Burton for reading and commenting on the manuscript and Rodrigo Del Cid for video edition.

LIST OF ABBREVIATIONS

β 1: proteasome Psmb1 subunit
 β 5: proteasome Psmb5 subunit
BDNF: brain-derived neurotrophic factor
CM: Cerebral malaria
CNS: central nervous system
DAPI : 4'-6-diamino-2-phenylindole
ECM: experimental cerebral malaria
GADPH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ICAM-1: intercellular adhesion molecule
IFN- γ : interferon- γ
LMP2: immunoproteasome Psmb9 subunit
LMP7: immunoproteasome Psmb8 subunit
LT- α : lymphotoxin- α
NCAM: neural cell adhesion molecule
PBS: phosphate buffer saline
pRBC: parasitized red blood cells
TNF- α : tumor necrosis factor- α
VCAM-1: vascular cell adhesion molecule
Genes names are given as low-case italics abbreviations of the corresponding protein abbreviation specified above.

REFERENCES

1. Armah, H.; Wired, E. K.; Doodoo, A. K.; Adjei, A. A.; Tettey, Y.; Gyasi, R., Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. *Int J Environ Res Public Health* **2005**, 2, (1), 123-31.
2. Bentivoglio, M.; Mariotti, R.; Bertini, G., Neuroinflammation and brain infections: Historical context and current perspectives. *Brain Res Rev* **2010**, 66 (1-2), 152-73.
3. Boivin, M. J.; Bangirana, P.; Byarugaba, J.; Opoka, R. O.; Idro, R.; Jurek, A. M.; John, C. C., Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics* **2007**, 119, (2), e360-6.
4. Idro, R.; Kakooza-Mwesige, A.; Balyejussa, S.; Mirembe, G.; Mugasha, C.; Tugumisirize, J.; Byarugaba, J., Severe neurological sequelae and behaviour problems after cerebral malaria in Ugandan children. *BMC Res Notes* **2010**, 3, 104.
5. Idro, R.; Marsh, K.; John, C. C.; Newton, C. R., Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatr Res* **2010**, 68, (4), 267-74.
6. Holding, P. A.; Snow, R. W., Impact of Plasmodium falciparum malaria on performance and learning: review of the evidence. *Am J Trop Med Hyg* **2001**, 64, (1-2 Suppl), 68-75.
7. Medana, I. M.; Idro, R.; Newton, C. R., Axonal and astrocyte injury markers in the cerebrospinal fluid of Kenyan children with severe malaria. *J Neurol Sci* **2007**, 258, (1-2), 93-8.
8. Rao, A.; Kumar, M. K.; Joseph, T.; Bulusu, G., Cerebral malaria: insights from host-parasite protein-protein interactions. *Malar J* **2010**, 9, 155.
9. Cunha, C.; Brambilla, R.; Thomas, K. L., A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* **2010**, 3, 1.
10. Gordon, T., The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus* **2009**, 26, (2), E3.
11. Lu, B., BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* **2003**, 10, (2), 86-98.
12. Delahaye, N. F.; Coltel, N.; Puthier, D.; Barbier, M.; Benech, P.; Joly, F.; Iraqi, F. A.; Grau, G. E.; Nguyen, C.; Rihet, P., Gene expression analysis reveals early changes in several molecular pathways in cerebral malaria-susceptible mice versus cerebral malaria-resistant mice. *BMC Genomics* **2007**, 8, 452.
13. Marin-Garcia, P.; Sanchez-Nogueiro, J.; Diez, A.; Leon-Otegui, M.; Linares, M.; Garcia-Palencia, P.; Bautista, J. M.; Miras-Portugal, M. T., Altered nucleotide receptor expression in a murine model of cerebral malaria. *J Infect Dis* **2009**, 200, (8), 1279-88.
14. Dong, C.; Upadhyay, S. C.; Ding, L.; Smith, T. K.; Hegde, A. N., Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. *Learn Mem* **2008**, 15, (5), 335-47.
15. Kiss, J. Z.; Troncoso, E.; Djebbara, Z.; Vutsits, L.; Muller, D., The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Res Brain Res Rev* **2001**, 36, (2-3), 175-84.
16. Murphy, J. A.; Franklin, T. B.; Rafuse, V. F.; Clarke, D. B., The neural cell adhesion molecule is necessary for normal adult retinal ganglion cell number and survival. *Mol Cell Neurosci* **2007**, 36, (2), 280-92.

17. Seo, H.; Kim, W.; Isacson, O., Compensatory changes in the ubiquitin-proteasome system, brain-derived neurotrophic factor and mitochondrial complex II/III in YAC72 and R6/2 transgenic mice partially model Huntington's disease patients. *Hum Mol Genet* **2008**, 17, (20), 3144-53.
18. Bingol, B.; Sheng, M., Deconstruction for reconstruction: the role of proteolysis in neural plasticity and disease. *Neuron* **2011**, 69, (1), 22-32.
19. Enstrom, A.; Onore, C.; Tarver, A.; Hertz-Picciotto, I.; Hansen, R.; Croen, L.; Van de Water, J.; Ashwood, P., Peripheral blood leukocyte production of BDNF following mitogen stimulation in early onset and regressive autism. *Am. J. Biochem. & Biotech.* **2008**, 4, (2), 121-129.
20. Fukami, E.; Nakayama, A.; Sasaki, J.; Mimura, S.; Mori, N.; Watanabe, K., Underexpression of neural cell adhesion molecule and neurotrophic factors in rat brain following thromboxane A(2)-induced intrauterine growth retardation. *Early Hum Dev* **2000**, 58, (2), 101-10.
21. Rubinsztein, D. C., The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **2006**, 443, (7113), 780-6.
22. Pouvelle, B.; Matarazzo, V.; Jurzynski, C.; Nemeth, J.; Ramharter, M.; Rougon, G.; Gysin, J., Neural cell adhesion molecule, a new cytoadhesion receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes capable of aggregation. *Infect Immun* **2007**, 75, (7), 3516-22.
23. Zuccato, C.; Cattaneo, E., Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol* **2009**, 5, (6), 311-22.
24. Cabrales, P.; Zanini, G. M.; Meays, D.; Frangos, J. A.; Carvalho, L. J., Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction, and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *Am J Pathol* **2010**, 176, (3), 1306-15.
25. Carroll, R. W.; Wainwright, M. S.; Kim, K. Y.; Kidambi, T.; Gomez, N. D.; Taylor, T.; Haldar, K., A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS One* **2010**, 5, (10).
26. Lackner, P.; Beer, R.; Heussler, V.; Goebel, G.; Rudzki, D.; Helbok, R.; Tannich, E.; Schmutzhard, E., Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* **2006**, 32, (2), 177-88.
27. Penet, M. F.; Viola, A.; Confort-Gouny, S.; Le Fur, Y.; Duhamel, G.; Kober, F.; Ibarrola, D.; Izquierdo, M.; Coltel, N.; Gharib, B.; Grau, G. E.; Cozzone, P. J., Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci* **2005**, 25, (32), 7352-8.
28. Brian de Souza, J.; Hafalla, J. C.; Riley, E. M.; Couper, K. N., Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* **2009**, 137, (5), 755-72.
29. Livak, K. J.; Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, 25, (4), 402-8.
30. Hunt, N. H.; Golenser, J.; Chan-Ling, T.; Parekh, S.; Rae, C.; Potter, S.; Medana, I. M.; Miu, J.; Ball, H. J., Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol* **2006**, 36, (5), 569-82.
31. Lou, J.; Lucas, R.; Grau, G. E., Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev* **2001**, 14, (4), 810-20, table of contents.
32. Medana, I. M.; Turner, G. D., Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* **2006**, 36, (5), 555-68.

33. Pierrot, C.; Adam, E.; Lafitte, S.; Godin, C.; Dive, D.; Capron, M.; Khalife, J., Age-related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats. *Exp Parasitol* **2003**, 104, (1-2), 81-5.
34. White, N. J.; Turner, G. D.; Medana, I. M.; Dondorp, A. M.; Day, N. P., The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol* **2010**, 26, (1), 11-5.
35. Jennings, V. M.; Actor, J. K.; Lal, A. A.; Hunter, R. L., Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. *Infect Immun* **1997**, 65, (11), 4883-7.
36. Lovegrove, F. E.; Gharib, S. A.; Patel, S. N.; Hawkes, C. A.; Kain, K. C.; Liles, W. C., Expression microarray analysis implicates apoptosis and interferon-responsive mechanisms in susceptibility to experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* **2007**, 171, (6), 1894-903.
37. Kwak, M. K.; Wakabayashi, N.; Greenlaw, J. L.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W., Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **2003**, 23, (23), 8786-94.
38. Nguyen, T. P.; Soukup, V. M.; Gelman, B. B., Persistent hijacking of brain proteasomes in HIV-associated dementia. *Am J Pathol* **2010**, 176, (2), 893-902.
39. Chen, Q.; Schlichtherle, M.; Wahlgren, M., Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev* **2000**, 13, (3), 439-50.
40. Engwerda, C. R.; Mynott, T. L.; Sawhney, S.; De Souza, J. B.; Bickle, Q. D.; Kaye, P. M., Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med* **2002**, 195, (10), 1371-7.
41. Hunt, N. H.; Grau, G. E., Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* **2003**, 24, (9), 491-9.
42. Weiser, S.; Miu, J.; Ball, H. J.; Hunt, N. H., Interferon-gamma synergises with tumour necrosis factor and lymphotoxin-alpha to enhance the mRNA and protein expression of adhesion molecules in mouse brain endothelial cells. *Cytokine* **2007**, 37, (1), 84-91.
43. Groettrup, M.; Kirk, C. J.; Basler, M., Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol* **2010**, 10, (1), 73-8.
44. Aisa, B.; Gil-Bea, F. J.; Solas, M.; Garcia-Alloza, M.; Chen, C. P.; Lai, M. K.; Francis, P. T.; Ramirez, M. J., Altered NCAM expression associated with the cholinergic system in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **2010**, 20, (2), 659-68.
45. Vutsits, L.; Djebbara-Hannas, Z.; Zhang, H.; Paccaud, J. P.; Durbec, P.; Rougon, G.; Muller, D.; Kiss, J. Z., PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur J Neurosci* **2001**, 13, (7), 1391-402.
46. Turner, G. D.; Morrison, H.; Jones, M.; Davis, T. M.; Looareesuwan, S.; Buley, I. D.; Gatter, K. C.; Newbold, C. I.; Pukritayakamee, S.; Nagachinta, B.; et al., An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol* **1994**, 145, (5), 1057-69.
47. Pino, P.; Taoufiq, Z.; Nitchau, J.; Vouldoukis, I.; Mazier, D., Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost* **2005**, 94, (2), 336-40.
48. Combes, V.; El-Assaad, F.; Faille, D.; Jambou, R.; Hunt, N. H.; Grau, G. E., Microvesiculation and cell interactions at the brain-endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. *Prog Neurobiol* **2010**, 91 (2), 140-51.

49. Amante, F. H.; Stanley, A. C.; Randall, L. M.; Zhou, Y.; Haque, A.; McSweeney, K.; Waters, A. P.; Janse, C. J.; Good, M. F.; Hill, G. R.; Engwerda, C. R., A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* **2007**, 171, (2), 548-59.
50. Baptista, F. G.; Pamplona, A.; Pena, A. C.; Mota, M. M.; Pied, S.; Vigario, A. M., Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect Immun* **2010**, 78, (9), 4033-9.
51. Franke-Fayard, B.; Janse, C. J.; Cunha-Rodrigues, M.; Ramesar, J.; Buscher, P.; Que, I.; Lowik, C.; Voshol, P. J.; den Boer, M. A.; van Duinen, S. G.; Febbraio, M.; Mota, M. M.; Waters, A. P., Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, (32), 11468-73.
52. Greenberg, M. E.; Xu, B.; Lu, B.; Hempstead, B. L., New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci* **2009**, 29, (41), 12764-7.
53. Waterhouse, E. G.; Xu, B., New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci* **2009**, 42, (2), 81-9.
54. Winkelstein, B. A.; Kras, J. V., Is there an antinociceptive role for peripheral brain-derived neurotrophic factor? *Spine J* **2010**, 10, (8), 733-5.
55. Ebadi, M.; Bashir, R. M.; Heidrick, M. L.; Hamada, F. M.; Refaey, H. E.; Hamed, A.; Helal, G.; Baxi, M. D.; Cerutis, D. R.; Lassi, N. K., Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int* **1997**, 30, (4-5), 347-74.
56. Miu, J.; Hunt, N. H.; Ball, H. J., Predominance of interferon-related responses in the brain during murine malaria, as identified by microarray analysis. *Infect Immun* **2008**, 76, (5), 1812-24.
57. Donovan, M. J.; Lin, M. I.; Wiegand, P.; Ringstedt, T.; Kraemer, R.; Hahn, R.; Wang, S.; Ibanez, C. F.; Rafii, S.; Hempstead, B. L., Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* **2000**, 127, (21), 4531-40.
58. Medana, I. M.; Esiri, M. M., Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain* **2003**, 126, (Pt 3), 515-30.
59. Sommerfeld, M. T.; Schweigreiter, R.; Barde, Y. A.; Hoppe, E., Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an involvement of the proteasome and differential regulation of TrkA and TrkB. *J Biol Chem* **2000**, 275, (12), 8982-90.
60. Desruisseaux, M. S.; Iacobas, D. A.; Iacobas, S.; Mukherjee, S.; Weiss, L. M.; Tanowitz, H. B.; Spray, D. C., Alterations in the brain transcriptome in *Plasmodium berghei* ANKA infected mice. *Journal of Neuroparasitology* **2010**, 1, 1-8.
61. Gavilan, M. P.; Castano, A.; Torres, M.; Portavella, M.; Caballero, C.; Jimenez, S.; Garcia-Martinez, A.; Parrado, J.; Vitorica, J.; Ruano, D., Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects. *J Neurochem* **2009**, 108, (1), 260-72.
62. Santos, A. R.; Comprido, D.; Duarte, C. B., Regulation of local translation at the synapse by BDNF. *Prog Neurobiol* **2010**.
63. Cajigas, I. J.; Will, T.; Schuman, E. M., Protein homeostasis and synaptic plasticity. *EMBO J* **2010**, 29, (16), 2746-52.
64. Di Filippo, M.; Sarchielli, P.; Picconi, B.; Calabresi, P., Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. *Trends Pharmacol Sci* **2008**, 29, (8), 402-12.

65. Lisak, R. P.; Benjamins, J. A.; Bealmear, B.; Nedelkoska, L.; Yao, B.; Land, S.; Studzinski, D., Differential effects of Th1, monocyte/macrophage and Th2 cytokine mixtures on early gene expression for glial and neural-related molecules in central nervous system mixed glial cell cultures: neurotrophins, growth factors and structural proteins. *J Neuroinflammation* **2007**, 4, 30.
66. Bisaz, R.; Conboy, L.; Sandi, C., Learning under stress: a role for the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neurobiol Learn Mem* **2009**, 91, (4), 333-42.
67. Muller, D.; Djebbara-Hannas, Z.; Jourdain, P.; Vutskits, L.; Durbec, P.; Rougon, G.; Kiss, J. Z., Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97, (8), 4315-20.
68. Idro, R.; Jenkins, N. E.; Newton, C. R., Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol* **2005**, 4, (12), 827-40.
69. Ho, M.; White, N. J., Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol* **1999**, 276, (6 Pt 1), C1231-42.
70. Hearn, J.; Rayment, N.; Landon, D. N.; Katz, D. R.; de Souza, J. B., Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun* **2000**, 68, (9), 5364-76.
71. de Souza, J. B.; Riley, E. M., Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect* **2002**, 4, (3), 291-300.
72. Schofield, L.; Grau, G. E., Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* **2005**, 5, (9), 722-35.
73. van der Heyde, H. C.; Nolan, J.; Combes, V.; Gramaglia, I.; Grau, G. E., A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol* **2006**, 22, (11), 503-8.
74. Lacerda-Queiroz, N.; Rodrigues, D. H.; Vilela, M. C.; Miranda, A. S.; Amaral, D. C.; Camargos, E. R.; Carvalho, L. J.; Howe, C. L.; Teixeira, M. M.; Teixeira, A. L., Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in Plasmodium berghei (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol* **2010**, 125, (3), 271-8.
75. Sein, K. K.; Maeno, Y.; Thuc, H. V.; Anh, T. K.; Aikawa, M., Differential sequestration of parasitized erythrocytes in the cerebrum and cerebellum in human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* **1993**, 48, (4), 504-11.
76. Aharoni, R.; Eilam, R.; Domev, H.; Labunskay, G.; Sela, M.; Arnon, R., The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, (52), 19045-50.
77. Lackner, P.; Part, A.; Burger, C.; Dietmann, A.; Broessner, G.; Helbok, R.; Reindl, M.; Schmutzhard, E.; Beer, R., Glatiramer acetate reduces the risk for experimental cerebral malaria: a pilot study. *Malar J* **2009**, 8, 36.

Proteomic approaches to identifying carbonylated proteins in brain tissue

María Linares^{a,b}, Patricia Marín-García^{a,b,c}, Darío Méndez^{a,b,¶},
Antonio Puyet^{a,b}, Amalia Diez^{a,b} and José M. Bautista^{a,b,*}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology IV, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.

^bInstituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Universidad Complutense de Madrid.

^cDepartment of Morphological Sciences and Biomedicine, Universidad Europea de Madrid, Facultad de Ciencias Biomédicas, Campus de Villaviciosa de Odón, 28640, Madrid, Spain.

[¶]Permanent address: Department of Biology - Universidad de Cartagena (CO).

* Corresponding author

e-mails: marialinares@vet.ucm.es; patricia8149@bio.ucm.es; dmmendez@vet.ucm.es; apuyet@vet.ucm.es; adiez@vet.ucm.es; jmbau@vet.ucm.es

Published in *Journal of Proteome Research* 10 (4): 1719-1727

ABSTRACT

Oxidative stress plays a critical role in the pathogenesis of a number of diseases. The carbonyl end products of protein oxidation are among the most commonly measured markers of oxidation in biological samples. Protein carbonyl functional groups may be derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to render a stable 2,4- dinitrophenylhydrazone-protein (DNP-protein) and the carbonyl contents of individual proteins then determined by two-dimensional electrophoresis followed by immunoblotting using specific anti-DNP antibodies. Unfortunately, derivatization of proteins with DNPH could affect their mass spectrometry (MS) identification. This problem can be overcome using non-treated samples for protein identification. Nevertheless, derivatization could also affect their mobility, which might be solved by performing the derivatization step after the initial electrophoresis. Here, we compare two-dimensional redox proteome maps of mouse cerebellum acquired by performing the DNPH derivatization step before or after electrophoresis, and detect differences in protein patterns. When the same approach is used for protein detection and identification, both methods resulted useful to identify carbonylated proteins. However, whereas pre-DNPH derivatized proteins were successfully analyzed, high background staining complicated the analysis when the DNPH reaction was performed after transblotting. Comparative data on protein identification using both methods are provided.

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) build up in different physiological and disease conditions as a consequence of an imbalance between their formation and neutralization by antioxidant systems. This situation causes oxidative stress, which in turn promotes cell alterations such as accumulation of oxidized-damaged molecules, increased levels of dysfunctional macromolecules and severely compromised cell homeostasis ¹⁻⁴. Brain tissue is particularly vulnerable to oxidative damage because of its high oxygen requirements, low antioxidant levels and high polyunsaturated fatty acid and redox transition metal ion contents ¹.

Several types of molecules are directly affected by oxidative damage. However, the oxidation of proteins is of particular concern since it leads to aggregation, polymerization, unfolding or conformational changes that may confer a loss of structural or functional activity ¹. Although several protein oxidative modifications exist, most oxidized proteins exhibit carbonyl groups (aldehydes and ketones) ^{2, 4, 5}. These groups are introduced into the proteins through a variety of oxidative pathways ⁶. ROS can react directly with the protein (Figure 1A, B) or can react with other molecules, generating products capable of reacting with proteins ⁶. A consequence of this modification is that they can react with lysine residues, cross-link and generate protein aggregates. These oxidized aggregates are not readily degraded in the cell and their build up causes cell dysfunction ².

Carbonyl groups are good markers of protein oxidation since they are one of the final byproducts of multiple oxidation pathways that occur in the cell ⁷. Moreover, since carbonyl groups are chemically stable, they are very useful for laboratory analysis ^{3, 4, 7-9}. The carbonyl contents of individual proteins may be assessed using the following procedures, in which the order of steps a and b may be inverted: (i) incorporation of a dinitrophenyl group through reaction of the carbonyl with dinitrophenylhydrazine (DNPH), which leads to the formation of a stable dinitrophenylhydrazone (DNP) product (Figure 1C), (ii) two-dimensional (2D) electrophoresis and (iii), immunoblotting using anti-DNP antibodies ^{3-5, 7, 9}. A third alternative incorporates the DNPH derivatization step after the isoelectric focusing (IEF) ^{10, 11}.

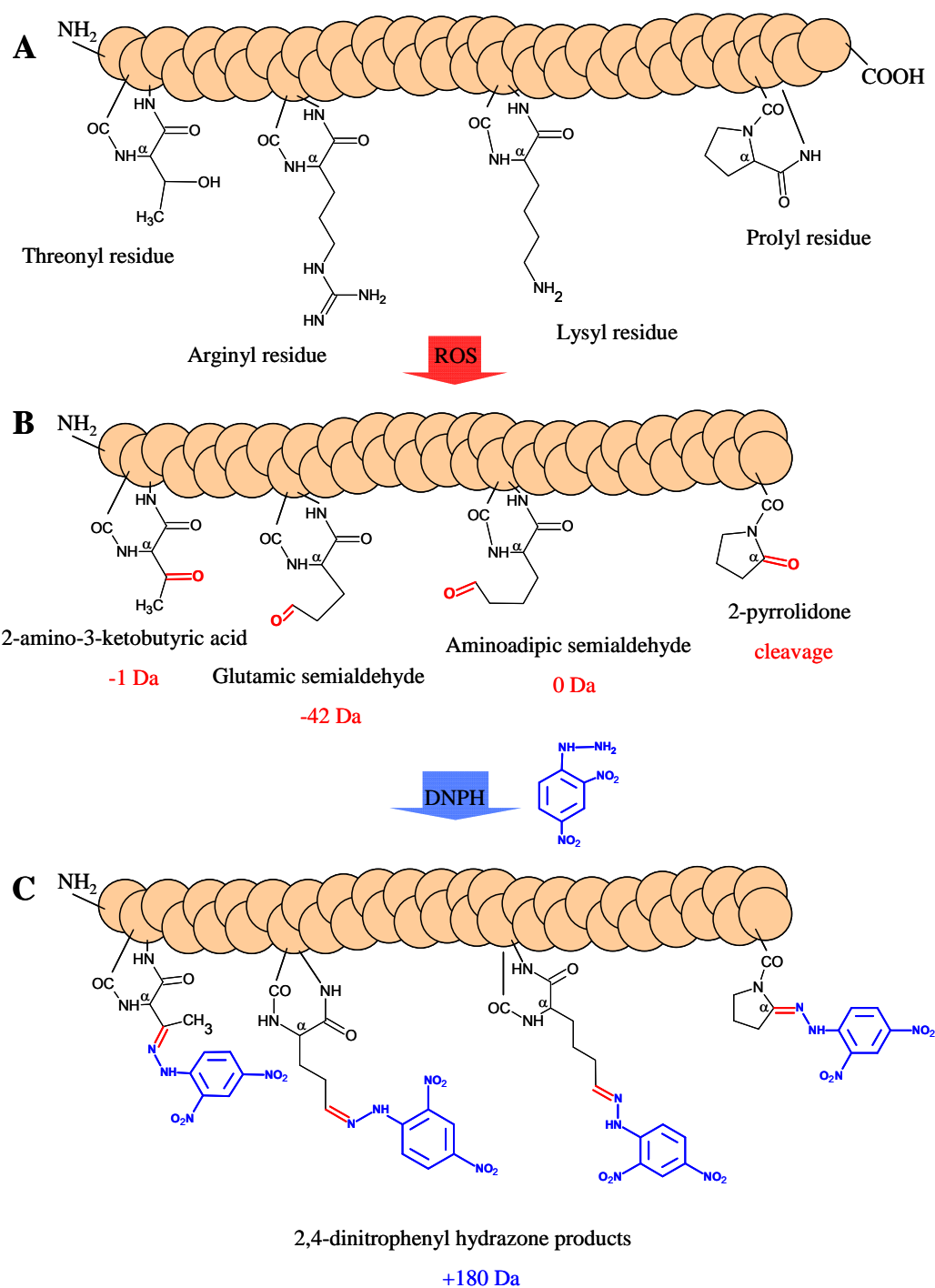


Figure 1.- Protein carbonyls produced by direct oxidation of amino acid side chains after its reaction with ROS. The structure of several amino acid residues is shown in the backbone of a “hypothetical” protein (A). After its interaction with ROS, oxidation produces a carbonyl derivative which could modify its molecular weight (B). Carbonyl groups and molecular weight modifications are shown in red. Dinitrophenylhydrazine (DNPH) reacts with the carbonyl groups generating a stable dinitrophenylhydrazone product (C). The molecular weight modification produced by this reaction is indicated in blue.

Spots detected in the 2D Western blots (2D oxyblots) and 2D stained gels can be matched by computer assisted image analysis. The carbonyl content of each protein is normalized to its total protein quantity through a relation between the chemiluminescence signal intensity detected in the immunoblots and the signal of the same protein in a stained gel. Once a spot is identified as modified by DNPH, it is excised from the gel, digested with trypsin and then analysed by mass spectrometry (MS) ¹².

Biological samples can be derivatized with DNPH before the 2D electrophoresis step ^{7, 13-17}. However, since this pre-treatment could affect subsequent MS identification ^{18, 19}, some authors advocate the use of non-treated samples for protein identification ^{18, 20, 21}. DNPH derivatization can alter the molecular weight and/or isoelectric point of proteins ^{3, 5, 22, 23}.

Thus, the use of non-treated proteins in gels for protein identification and DNPH-treated proteins for Western blotting could lead to potential mismatching of carbonylated spots in the 2D gel for MS. To minimize this, samples can be derivatized with DNPH once the proteins have been transferred to the membrane ^{22, 24}, and this will also improve the low MS scores attributed to molecular weight modifications due to derivatization.

Since the correct MS identification of a protein also depends on the correct “matching” of spots detected in the Western blot with those observed in the gels, we compared the two most contrasting situations: this is, comparison of the use of DNPH-treated samples to prepare the 2D gels followed by Western blotting, with the use of untreated samples for 2D electrophoresis followed by DNPH-derivatization. This is the first side-by-side comparison of two of the most popular oxyproteomics approaches used today.

MATERIALS AND METHODS

Materials

3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), decanoyl-N-methylglucamide (MEGA 10), L- α -lysophosphatidylcholine (LPC), DNPH, anti-2-4-DNP primary antibody (Ref. D9656) and α -cyano-4-hydroxytranscinnamic acid matrix were obtained from Sigma (Saint Louis, USA). Immobilized pH gradient (IPG) strips and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit-Ig secondary antibody were purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) free protease inhibitor cocktail and sequencing grade trypsin were from Roche Diagnostics (Manheim, Germany), polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes from Millipore (Massachusetts, USA) and SuperSignal from Pierce (Rockford, USA).

Sample preparation

All experiments were performed at the Universidad Complutense de Madrid according to the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science. Six adult male C57Bl/6 mice were sacrificed by cervical dislocation and decapitation. The brain was removed and the cerebellum dissected on ice and stored at -80°C until needed. Cerebella were pooled and homogenized in modified RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8 and 50 mM NaCl, supplemented with detergents: 3% (w/v) CHAPS; 0.5% (w/v) MEGA 10; 0.5% (w/v) LPC, and EDTA free protease inhibitor cocktail]. For protein extraction, the cerebellum suspension was vortexed for 1 h in intervals of 10 min and centrifuged twice (13,000 xg, 30 min). After centrifugation, the pellet was discarded and the extracted proteins recovered in the supernatant and quantified using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc, Munich, Germany) following the manufacturer's instructions.

Four out of 25 mg of protein were derivatized with DNPH as previously described⁷ with some modifications. Briefly, proteins were denatured at 100°C for 3 min at 100° C in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS) 6%. Derivatization was performed adding one volume of a solution containing 10 mM DNPH in 10%

trifluoroacetic acid and incubating 10 min at 25°C. The mixture was neutralized adding one volume of stopping solution (2M Tris, 30% glycerol and 15% β -mercaptoethanol).

Derivatized and non derivatized proteins were precipitated using acetone at room temperature and resuspended in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 3% (w/v) CHAPS, 0.5% (w/v) MEGA-10, 0.5% (w/v) LPC, and 10 mM dithioerythritol. Proteins were quantified using the Bio-Rad Protein Assay to adjust the protein loss.

Two-dimensional gel separation of cerebellar proteins

200 μ g of protein were cup loaded onto IPG strips (pH 3-11, 18 cm.) previously hydrated overnight with a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 100 mM DeStreak and 2% ampholites at pH 3-11. For first-dimensional separation, IEF was performed using the IPGphor 3 IEF system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) at 20°C. The voltage was gradually ramped in a step-and-hold manner to 1000 V in three steps: 1 h 120V, 1 h 500 V, and 2 h 500-1000 V. This voltage was increased to 4000V in a linear gradient (1000-4000V) over the next 9 h. The run was terminated after ~70.000 V h.

The focused strips were equilibrated in equilibration solution (100 mM Tris 6.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS) containing 0.5% dithiothreitol (DTT) reducing agent for 12 min, and transferred to 4.5% iodoacetamide equilibration solution for a further 5 min. The second-dimension SDS-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was run on homogeneous 12% T and 2.6% C casted polyacrylamide gels. Electrophoresis was carried out at 20°C, 2 W/gel for 30 min and 20 W/gel for 4 h using an Ettan-Dalt six unit. For each experimental condition, 5 gels were run in parallel under identical 2D electrophoresis conditions. Two gels were stained with colloidal Coomassie brilliant blue ²⁵ to visualize total proteins and for subsequent protein identification.

Western blot analysis

Three of the five gels prepared for each experimental condition were transferred to PVDF membranes. Transfer efficiency was checked to observe that it was similar in both methods. Carbonyl groups in the transferred membranes containing derivatized proteins were immunodetected as previously described ¹⁵. After blocking, membranes were incubated for 2 h with a 1/4000 dilution of the anti-2,4-DNP primary antibody in PBS -0.05% Tween containing 10% skimmed milk powder (w/v). The blots were then washed 3-4 times in PBS-Tween solution for 5 min and one more time in PBS-Tween containing milk (as above) for 15 min. Next, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit-Ig secondary antibody at 1/5000 dilution in PBS-Tween containing milk for 1 h. Membranes were washed twice for 5 min in PBS-Tween containing milk, followed by 2 washes in PBS-Tween solution and finally 2 washes using PBS solution prior to visualization.

Membranes containing the non derivatized samples were derivatized as previously described ²² with minor modifications as follows: membranes were equilibrated in 20% (v/v) methanol-80% TBS for 5 min and incubated in 2N HCl for 5 min. Next, membranes were incubated in a DNPH solution (0.5 mM) in 2N HCl for 5 min. Membranes were washed 10 times in HCl 2 N, 30 times in methanol 100%, once in PBS-Tween and 5 times in PBS. The greater the number of washings, the lower the background induced by DNPH excess. Then, blocking and immunodetection was performed as previously described using a 1/40,000 dilution of the anti-2,4-DNP antibody. SuperSignal was used as the chemiluminescent substrate for visualization.

Trypsin digestion and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry

Spots of interest were manually excised from the 2D gels, in-gel reduced, alkylated and then digested with trypsin as described elsewhere ²⁶. Briefly, spots were washed twice in water, shrunk 15 min with 100% acetonitrile and dried in a Savant SpeedVac for 30 min. The samples were then reduced using 10 mM DTT in

25 mM ammonium bicarbonate for 30 min at 56°C and subsequently alkylated with 55 mM iodoacetamide in 25 mM ammonium bicarbonate for 20 min in the dark. Finally, samples were digested with 12.5 ng/μl sequencing grade trypsin in 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) overnight at 37°C. After digestion, the supernatant was collected and 1 μl was spotted onto a MALDI target plate and allowed to air-dry at room temperature. Next, 0.4 μl of a 3 mg/ml of α-cyano-4-hydroxytranscinnamic acid matrix in 50% acetonitrile was added to the dried peptide spots and allowed, again, to air-dry at room temperature.

MALDI time-of-flight (TOF) MS analyses were performed in a 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Warrington, UK) operated in positive reflector mode, with an accelerating voltage of 20.000 V. Mass spectra were then acquired for peptide mass fingerprinting (PMF).

Proteins were identified by comparing the trypsin-digested peptide masses with the data provided in two databases (NCBI Date 080626 with 6640940 sequences, 2276975120 residues and UniprotKB-SwissProt v.56.6) separately using MASCOT 1.9 (<http://www.matrixscience.com>) through the Global Protein Server v3.5 from Applied Biosystems. The parameters for the PMF search were as follows: modification on cysteine residues by carboxyamidomethylation was set as the fixed modification; methionine oxidation was considered as a variable modification; the maximum number of missed tryptic cleavages was one; peptide mass tolerance was set to 50 ppm and monoisotopic masses were considered. In some cases, taxonomy was restricted to *Mus musculus*. All the identified proteins fulfilled the criterion of being significant ($P < 0.005$) according to probability based on the Mowse score.

Image and statistical analyses.

Gel and immunoblot images were analyzed using PDQuest software, version 8.0.1 (BioRad Laboratories Inc, Munich, Germany). Statistical analyses were performed using the Statgraphics Plus 5.1 software package.

RESULTS

Protein separation

Our comparative analysis of images of Coomassie blue-stained gels obtained using derivatized and non-derivatized samples revealed adequate resolution and spot differentiation across the two dimensions (Figure 2). However, differences were observed in the number of protein spots and their distribution pattern.

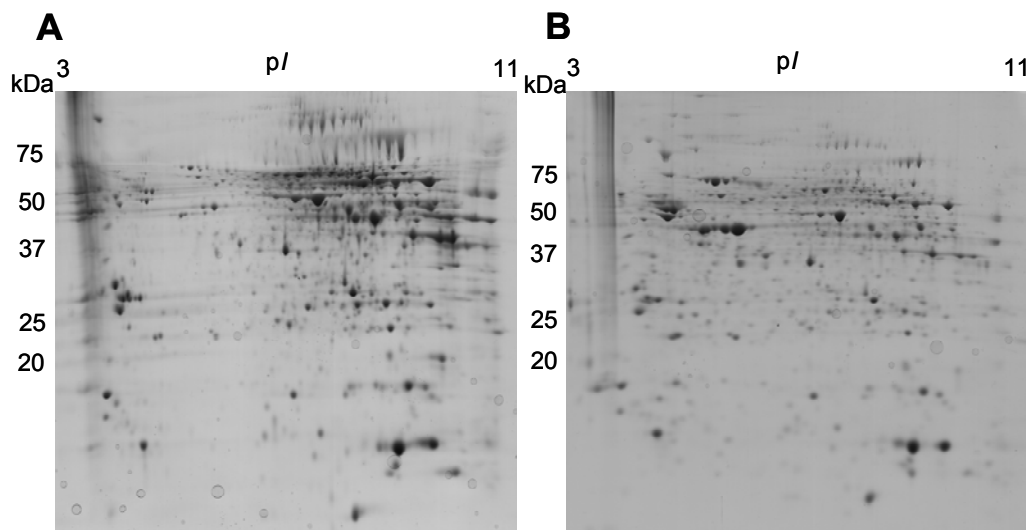


Figure 2.- Bidimensional SDS-PAGE of mouse cerebellum extracts stained with Coomassie brilliant blue. Samples derivatized with 2-4-dinitrophenylhydrazine before electrophoresis (A) or after transfer (B). In the gels containing pre-treated samples, enrichment of the basic range was observed while in those loaded with untreated samples, the acid range was enriched. Gels shown are representative of two independent experiments.

Pre-treatment with DNPH led to a greater number of spots. Automated analysis identified 1157 common spots between gel replicates (out of 1428 ± 75 total spots/gel) when pre-treated proteins were used (Figure 2A). In contrast, 802 spots were reproducibly detected in gel replicates containing non DNPH-treated proteins (out of 955 ± 67 total spots/gel) (Figure 2B). When the gel images obtained using the two technical approaches were compared, we detected 577 common spots. For both types of sample, gels exhibited specific areas of significant protein spot enrichment. However, in gels containing DNPH-treated proteins, this enrichment was observed in the basic range, while in gels loaded with non-DNPH-treated samples, protein spot enrichment appeared in the acid range. Vertical streaking was observed for

both sample types (Figure 2A, B) while horizontal streaking was reduced in gels containing non-treated proteins (Figure 2B).

Carbonyl modified proteins

In samples pre-derivatized or derivatized after membrane transfer with DNPH, carbonyl modified proteins were identified by Western blotting using the anti-DNP antibody (Figure 3). The minimal level of protein detection was similar in both methods (0.01-0.05 μ g).

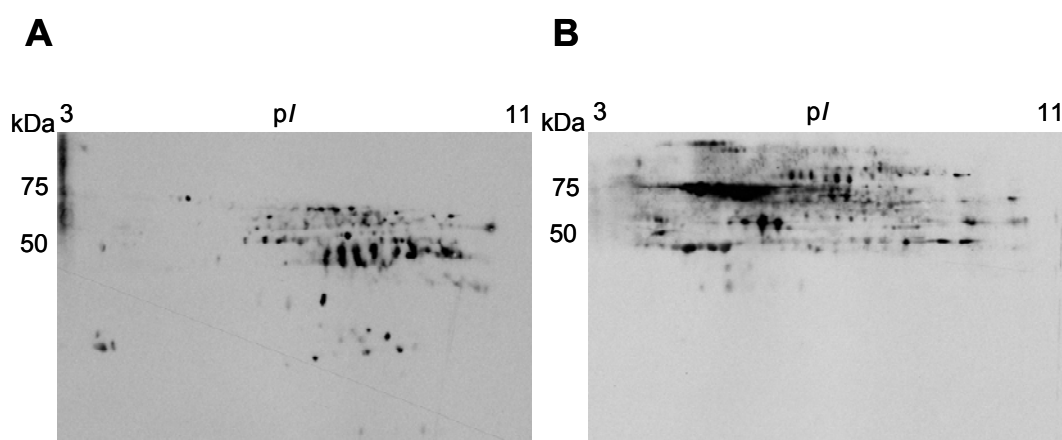


Figure 3.- Carbonyl modified proteins detected by Western blotting of the gels shown in Figure 2A and 2B, corresponding to samples previously derivatized with DNPH (A) or samples derivatized after transfer (B). Images are representative of three independent experiments.

2D oxyblots obtained from samples pre-derivatized with DNPH displayed 218 common modified spots among technical replicates (out of 311 ± 86 total spots) (Figure 3A), while samples derivatized with DNPH after membrane transfer, showed 303 common modified spots among replicates (out of 391 ± 51 total spots) (Figure 3B). Although a higher number of carbonyl modified protein spots was detected when the proteins were treated with DNPH after transfer to the blot, the samples pre-treated with DNPH showed improved reproducibility and reduced background staining (Figure 3).

To determine the number of spots that could be matched for potential MS identification in the gels, images of the 2D oxyblots and 2D gels stained with Coomassie blue were matched using PDQuest. Since automated matching was only

possible for gel-to-gel or blot-to-blot images –and not gel-to-blot images– the manual PDQuest option was used to identify the carbonylated protein spots in the preparative gels.

The Coomassie blue-stained gels yielded 155 out of the 218 modified spots (71%) in the 2D oxyblots of pre-treated samples. In contrast, only 134 of the 303 modified spots (44%) could be matched when the samples were treated after transfer to the blot. Computer assisted image analysis comparing images of the gels and 2D oxyblots obtained using the two approaches revealed only 37 common carbonyl modified protein spots identified by both methods.

To assess whether these 37 common carbonyl modified spots were identified as the same proteins, a selection of 14 protein spots were excised and subjected to MS. These spots were heterogeneously distributed across the isoelectric point and molecular weight ranges obtained in the 2D oxyblot (Figure 4A, B). The MS data revealed that all the excised spots were identified as the same proteins using either method (Table 1).

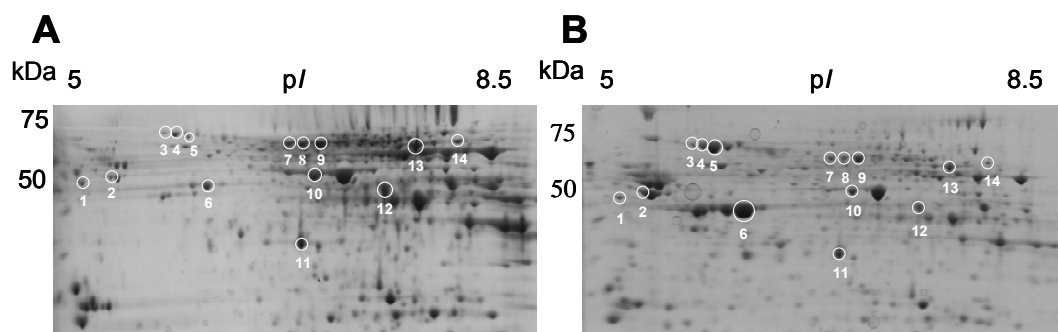


Figure 4.- Fourteen common carbonyl modified protein spots heterogeneously distributed across the isoelectric point and molecular weight ranges selected for subsequent protein identification by mass spectrometry in pre-derivatized gels (A) and non-treated gels (B).

Table 1. Identification of carbonylated proteins in mouse cerebellum

Spot No. ^(a)	Protein ID ^(b)	Accession No. ^(c)	No. peptides matched/ searched ^(d)		% coverage ^(e)		score ^(f)		MW (kDa)/ pI ^(g)	MW (kDa)/ pI predicted (PDQuest) ^(h)	
			Pre-blot	Post-blot	Pre-blot	Post-blot	Pre-blot	Post-blot		Pre-blot	Post-blot
1*	Vimentin	sp P20152 VIME_MOUSE	34/65	40/65	64	67	337	382	53.7/5.1	48.5/5.2	50.3/5.3
2*	γ -enolase	sp P17183 ENOG_MOUSE	21/37	28/65	49	55	237	215	47.6/5.0	49.8/5.4	52.4/5.4
3	Unnamed protein product	gi 74211333	32/65	39/65	48	53	299	363	68.2/5.3	68.4/5.8	73.6/5.9
4	Unnamed protein product	gi 74211333	37/65	44/65	53	55	387	448	68.2/5.3	67.7/5.9	72.9/6
5*	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A	gi 31560731	36/65	32/65	56	46	293	221	68.6/5.4	66.5/6	70.4/6
6	Creatine kinase, brain	gi 10946574	30/65	38/65	70	71	330	356	43.0/5.4	47.9/6.1	46.0/6.3
7*	Dihydropyrimidinase-related protein 2	sp O08553 DPYL2_MOUSE	19/54	38/65	36	69	150	398	62.6/6.0	63.3/6.8	66.8/7.0
8*	Dihydropyrimidinase-related protein 2	sp O08553 DPYL2_MOUSE	35/65	37/65	68	65	375	359	62.6/6.0	63.1/6.9	66.9/7.1
9*	Dihydropyrimidinase-related protein 2	sp O08553 DPYL2_MOUSE	35/65	38/65	65	72	375	411	62.6/6.0	62.6/7.1	66.2/7.3
10*	Alpha-enolase	sp P17182 ENOA_MOUSE	33/65	32/65	72	73	343	329	47.5/6.4	50.0/7.0	52.5/7.2
11*	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	sp P14152 MDHC_MOUSE	23/65	24/65	49	52	209	222	36.7/6.2	37.3/6.9	37.6/7.1
12 [†]	Glutamine synthetase	sp P15105 GLNA_MOUSE	27/65	20/65	56	35	347 (m)	309 (m)	42.8/6.6	46.9/7.6	46.9/7.8
							275 (p)	166 (p)			
							347 (m)	309 (m)	48.3/8.5		
							94 (p)	145 (p)			
	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	sp P51174 ACADL_MOUSE	14/65	20/65	36	40	347 (m)	309 (m)			
13*	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	sp P52480 KPYM_MOUSE	18/65	31/65	38	49	120	262	58.4/7.2	61.8/7.9	62.3/8.0
14*	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	sp P52480 KPYM_MOUSE	36/65	39/65	61	63	358	383	58.4/7.2	64.4/8.2	64.5/8.3

(a) Spot number as indicated in Figure 4. (b) Protein ID from NCBI database. (c) Accession numbers from NCBI database. (d) Number of matched peptides versus total number of peptides. (e) Coverage of the matched peptides in relation to the full-length sequence. (f) Probability-based MOWSE score. (g) Theoretical molecular mass (MW) (kDa) and isoelectric point (pI) from NCBI database. (h) Theoretical molecular mass (MW) (kDa) and pI from PDQuest analysis. (m) Probability-based MOWSE score for the protein mix. (p) Probability-based MOWSE score for the indicated protein. (*) Identification confirmed by MS/MS sequencing. (†) Spot 12 was identified as a mix of two different proteins. This spot was not used for statistical analyses.

These 14 protein spots were identified as encoded by 11 different mouse genes. Seven of the proteins were related to metabolism and energy processes: γ and α enolase and pyruvate kinase (glycolytic enzymes), malate dehydrogenase (citric acid cycle enzyme), long chain specific acyl-CoA dehydrogenase (involved in fatty acid and branched chain amino-acid metabolism), glutamine synthetase (essential role in nitrogen metabolism) and creatine kinase (an important energy reservoir).

Other proteins identified were structural proteins such as vimentin, an intermediate filament, and dihydropyrimidinase-related protein 2, necessary for remodelling of the cytoskeleton. A further protein identified was the ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A, which is responsible for acidifying the intracellular compartments. The last oxidized protein identified was a hypothetical protein related to heat shock protein 8, which contributes to producing the proper protein conformation.

In our experimental conditions, no significant differences ($p=0.220$) were observed between MS scores when DNPH pre-treated or post-treated samples were used (Table 1). To clarify whether DNPH pre-treatment modifies the isoelectric focusing or relative mobility of proteins during electrophoresis, we compared the isoelectric points and molecular weights calculated by the PDQuest software with the theoretical value predicted in the NCBI nr 080626 database (Table 1). Statistical analysis revealed no significant additive effect of DNPH pre-treatment causing a molecular weight change ($p= 0.983$) or significant differences in isoelectric point ($p=0.249$).

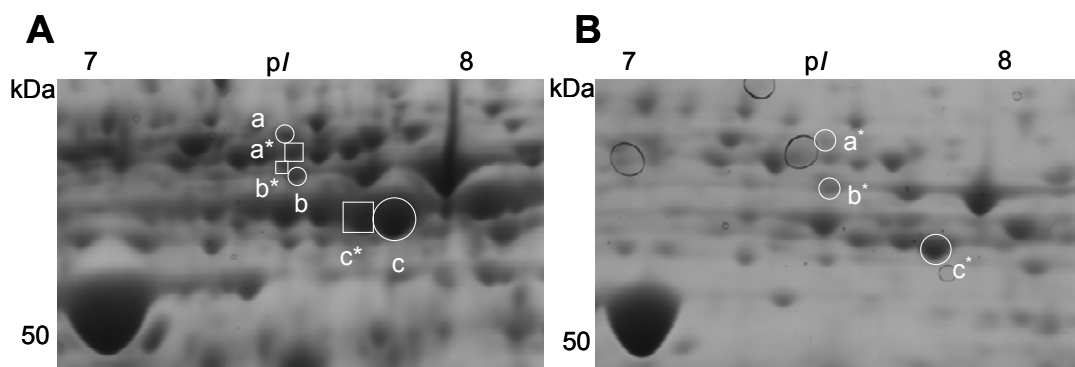


Figure 5.- Carbonyl modified spots in pre-treated gels not matching in the PDQuest analysis but close to a carbonyl modified spot in non-treated gels which were identified as the same protein. (A): A DNPH pre-treated gel. Spots matched by PDQuest analysis with spots in the untreated gel are indicated by circles. Spots identified as the same as spots in the non-treated gel are indicated by squares. (B): Spots in the non-treated gel. Carbonyl modified spots are indicated with an asterisk in both images. Spots with the same letter represent each pair of PDQuest-matched or coinciding spots.

Table 2. Identification of non-PDQuest matched carbonylated spots in both types of gel

Spot. No ^(a)	Protein ID ^(b)	Accession No. ^(c)	No. peptides matched/ searched ^(d)	% coverage ^(e)	score ^(f)	MW (kDa)/ pI ^(g)	MW(kDa)/ pI predicted (PDQuest) ^(h)
a* (Post)	Dihydropyrimidinase-related protein 1	sp P97427 DPYL1_MOUSE	15/65	24	199(m) 96(p)	62.5/6.6	68.3/7.7
	Electron transfer flavoprotein- ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	sp Q921G7 ETFD_MOUSE	14/65	27	199(m) 90(p)	68.9/7.3	
a* (Pre)	Dihydropyrimidinase-related protein 1	sp P97427 DPYL1_MOUSE	19/65	32	327(m) 139(p)	62.5/6.6	64.0/7.6
	Dihydropyrimidinase-related protein 4	sp O35098 DPYL4_MOUSE	15/65	34	327(m) 104(p)	62.5/6.5	
	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	sp Q99KE1 MAOM_MOUSE	16/65	29	327(m) 100(p)	66.4/7.5	
b* (Post)	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	sp P52480 KPYM_MOUSE	24/65	43	186	58.4/7.2	63.5/7.7
b* (Pre)	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	sp P52480 KPYM_MOUSE	14/65	26	402(m) 82(p)	58.4/7.2	62.7/7.6
	Dihydropyrimidinase-related protein 1	sp P97427 DPYL1_MOUSE	20/65	37	402(m) 164(p)	62.5/6.6	
	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	sp Q91WQ3 SYYC_MOUSE	17/65	32	402(m) 117(p)	59.4/6.6	
c* (Post)	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	sp P26443 DHE3_ MOUSE	42/65	53	365	61.6/8.1	57.9/7.9
c* (Pre)	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	sp P26443 DHE3_MOUSE	14/65	29	379(m) 79(p)	61.6/8.1	57.7/7.7
	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	sp Q03265 ATPA_MOUSE	23/65	43	379(m) 172 (p)	59.8/9.2	
	Succinyl-CoA:3-ketoacid- coenzyme A transferase 1, mitochondrial	sp Q9D0K2 SCOT_MOUSE	15/65	39	379(m) 97(p)	56.4/8.7	

(a) Spot letter as indicated in Figure 5. The type of gel is indicated in brackets: pre-blot DNPH treatment (Pre) and post-blot DNPH treatment (Post). (b) Protein ID from NCBI database. (c) Accession numbers from NCBI database. (d) Number of matched peptides versus total number of peptides. (e) Coverage of the matched peptides in relation to the full-length sequence. (f) Probability-based MOWSE score. (g) Theoretical molecular mass (MW) (kDa) and isoelectric point (pI) from NCBI database. (h) Theoretical molecular mass (MW) (kDa) and isoelectric point (pI) from PDQuest analysis. (m) Probability-based MOWSE score of the protein mix. (p) Probability-based MOWSE score of the indicated protein.

The low number of common modified spots detected by both methods could be attributed to slight variations in the migration properties of treated and untreated proteins, which could affect correct matching by the PDQuest software. To address this question, we conducted a MS analysis of some of the carbonyl modified spots in the DNPH pre-treated gels that appeared around the non-modified spots matched by PDQuest analysis to the modified spots in the gels containing non pre-treated samples. This MS analysis indicated that 50% of the surrounding spots excised from gels containing DNPH pre-treated samples coincided with the ones identified in the

gels containing non-treated samples (Figure 5 and Table 2). These results suggest that minor differences in migration between pre-treated and untreated extracts could affect matching of gel images obtained using the two procedures.

DISCUSSION

In this study, we compared the two most commonly used 2D PAGE oxyproteomic methods for identifying carbonylated proteins: (i) the widely used method of derivatizing samples with DNPH followed by 2D electrophoresis, in which carbonyl groups are subsequently detected in corresponding 2D Western blots using specific anti-DNP antibodies ^{7, 13-17} and (ii) derivatization of the blot with DNPH after 2D electrophoresis ^{22, 24}.

Because of the complexity of this methodology, we ensured that optimal conditions were fulfilled for all the gels/blots analyzed. First, we focused on sample preparation, trying to solubilise most proteins in the sample. To do this, we modified the RIPA buffer by adding the zwitterionic detergent MEGA 10 and the zwitterionic lipid LPC. These zwitterionic detergents improve the resolution of the membrane protein fraction in the sample ²⁷. After extraction, samples were differentially derivatized or not with DNPH and then processed in the same electrophoretic and transfer conditions.

The use of gels loaded with untreated samples for protein identification and DNPH treated samples run in parallel for 2D oxyblot analysis has been reported to solve the potential problems caused by the DNP moiety in MS identification ^{18-21, 28}. To investigate how protein matching and identification could be affected by these procedures, direct comparisons were made between 2D Coomassie blue-stained gels containing untreated and DNPH-treated samples.

In our hands, both sample treatments led to adequate separation of membrane proteins from the cerebellum, a tissue rich in these proteins. However, differences were detected in the protein patterns produced in the 2D gels. Thus, the different sample treatments led to differential areas of protein distribution

enrichment, and this precluded matching of 2D oxyblots of pre-treated samples with the 2D Coomassie-stained gels of untreated samples, as previously suggested ²². Some authors ¹¹ claim that differences in protein patterns produced by 2D electrophoresis are the consequence of differential protein precipitation or protein mobility (see below). A loss of proteins due to sample processing during DNPH-derivatization has also been reported ¹¹, though this contrasts with our results in that we detected more spots using the pre-DNPH-derivatized samples. Since 50% of these spots were also present in the gels prepared using non-treated samples, it could be that the derivatization step might differentially precipitate proteins.

The Western blot images of the oxidized proteins rendered by the two oxyproteomic approaches were also compared. Thus, although more carbonyl modified spots were detected when the proteins were derivatized with DNPH after electrophoresis, an improved background enhancing reproducibility between replicates was observed in the samples treated with DNPH before electrophoresis. Moreover, when Coomassie blue-stained gels were compared with Western blots for each method, more matching spots were detected when samples were treated before electrophoresis, consistent with reports that post-electrophoresis derivatization might produce high background staining ²⁹, which highlights the importance of clear backgrounds to define and identify oxidized proteins. High background staining not only hinders comparisons between 2D oxyblots but also complicates spot matching between Western-blot spots and preparative gels. However, the solvents used to remove background staining tend to wash off the proteins and several washings in aggressive chemicals were required in our experiments to decrease background staining.

When we compared the number of common spots detected by the two methods it was found that only 37 common spots appeared oxidized. MS analysis of a representative number of these spots confirmed that the same proteins were identified by both methods. Although some authors suggest that pre-treatment of proteins with DNPH gives rise to MS misidentification or unresolved data ^{18, 19}, in our experimental conditions, these protein spots were successfully identified by MS fingerprinting as described by others ²³. The fact that both methods yielded a sufficient number of peptides guarantees good protein identification, which could

depend on the protein size and its level of oxidation. High oxidation in small proteins is expected to generate a lower amount of non-modified peptides. Conversely, protein modification and derivatization could make difficult MS-identification in the cases where the complete genome is not still annotated in the databases.

Several authors claim that DNPH treatment modifies isoelectric focusing and/or molecular weight, which produces a change in protein mobility ^{11, 22, 23, 29}. However, we observed no major differences between isoelectric points or molecular weights predicted automatically by the PDQuest software and the real values predicted after MS identification. This is in agreement with the views of other authors, who also fail to observe major differences in protein electrophoretic positions after DNPH treatment ^{18, 19}. Thus, although we cannot exclude minor differences in the positions of DNPH treated and non-treated proteins, major changes in the molecular weight isoelectric point did not seem to affect protein matching in our brain tissue samples.

The low level of correspondence between the number of spots detected by the two methods could justify a combined approach to redox proteomics. In each method, missing spots could perhaps be attributed to their different capacity for carbonyl detection or to the different patterns observed in the preparative gels. This low correspondence could also be explained by a protein positioning effect that prevents correct matching by the PDQuest software in some areas. To address this potential effect, carbonylated spots rendered by both methods that were not matched by PDQuest analysis but appeared in nearby positions in the gel were subjected to mass spectrometry (MS).

Since some of the spots (50%) were identified as the same proteins by both methods, it is possible that minor differences between pre-treated and non-treated extracts could affect matching of the gel images. As indicated above, although no major effects on molecular weight and isoelectric point were observed, differences in protein patterns have been suggested by us and other authors ¹¹. Considering that (i), oxidative modifications *per se* often slightly alter a protein's electrophoretic properties such that it migrates as a satellite of the unmodified protein and (ii), a

single protein can undergo more than one type of oxidative modification ⁵, small differences between DNP spots and their unmodified protein counterparts could hinder comparisons between the modified spots detected by both methods.

CONCLUSIONS

In conclusion, although more horizontal streaking was produced when brain tissue extracts were DNPH-treated before their 2D electrophoretic separation, a larger number of spots was obtained. In addition, since a highly biased pattern was observed for the two methods, the use of non-treated extracts for identifying modified protein spots in DNPH pre-treated 2D oxyblots is not recommended for routine analysis. The DNPH pre-treated 2D oxyblots showed low background staining and improved reproducibility, which made it easier to compare the modified spots in the 2D oxyblots with the Coomassie-stained gels. This comparison yielded the largest number of matching spots. Given that the use of pretreated samples rendered similar MS fingerprinting identification scores, in our opinion, this approach seems the most appropriate for redox proteomics of brain tissue. Moreover, this method prevents further oxidative processes during the storage and manipulation, the washing is less aggressive and its handling shortened. However, before selecting any procedure for a given tissue, we would suggest a comparative analysis such as the present. Moreover, since these two methods do not show 100% efficiency, whenever possible, the combined use of the two redox-proteomics approaches guarantee identification of carbonylated proteins that match in both methods.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2007-67885 and BIO2010-17039) and by the Research Teams Consolidation Programme of the UCM (Research Team 920267-Comunidad de Madrid). M.L. holds a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (AP20061576). D.M was supported by the Universidad de Cartagena (CO),

the Alban Programme of High Level Scholarships for Latin America, European Union scholarship No. E06D101036CO and Colfuturo. We are particularly indebted to Dr. Montserrat Martínez-Gomariz, Lola Gutiérrez and María Luisa Hernáez from the Proteomics Facility of the Universidad Complutense de Madrid-Parque Científico de Madrid, Spain (UCM-PCM), which is a node of the ProteoRed-Genoma España Network. We thank Ana Burton for reading and commenting on the manuscript.

LIST OF ABBREVIATIONS

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate

2D: two-dimensional

DNP: 2,4-dinitrophenylhydrazone

DNPH: 2,4-dinitrophenylhydrazine

2D oxyblot: 2D Western blot

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

IEF: isoelectric focusing

IPG: immobilized pH gradient

LPC: L- α -lysophosphatidylcholine

MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization

MEGA 10: decanoyl-N-methylglucamide

MS: mass spectrometry

SDS-PAGE: SDS-Polyacrilamide gel electrophoresis

PVDF: polyvinylidene fluoride

PMF: peptide mass fingerprinting

ROS: reactive oxygen species

SDS: sodium dodecyl sulphate

TOF: time-of-flight.

REFERENCES

1. Butterfield, D. A.; Reed, T.; Newman, S. F.; Sultana, R., Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* **2007**, 43, (5), 658-77.
2. Cecarini, V.; Gee, J.; Fioretti, E.; Amici, M.; Angeletti, M.; Eleuteri, A. M.; Keller, J. N., Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1773, (2), 93-104.
3. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.; Colombo, R., Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* **2003**, 329, (1-2), 23-38.
4. Shacter, E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* **2000**, 32, (3-4), 307-26.
5. Madian, A. G.; Regnier, F. E., Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J Proteome Res* **2010**, 9, (8), 3766-80.
6. Dalle-Donne, I.; Aldini, G.; Carini, M.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A., Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* **2006**, 10, (2), 389-406.
7. Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E., Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **1994**, 233, 346-57.
8. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Colombo, R.; Giustarini, D.; Milzani, A., Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* **2006**, 52, (4), 601-23.
9. Shacter, E., Protein oxidative damage. *Methods Enzymol* **2000**, 319, 428-36.
10. Conrad, C. C.; Choi, J.; Malakowsky, C. A.; Talent, J. M.; Dai, R.; Marshall, P.; Gracy, R. W., Identification of protein carbonyls after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **2001**, 1, (7), 829-34.
11. Reinheckel, T.; Korn, S.; Mohring, S.; Augustin, W.; Halangk, W.; Schild, L., Adaptation of protein carbonyl detection to the requirements of proteome analysis demonstrated for hypoxia/reoxygenation in isolated rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **2000**, 376, (1), 59-65.
12. Butterfield, D. A.; Abdul, H. M.; Newman, S.; Reed, T., Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. *NeuroRx* **2006**, 3, (3), 344-57.
13. Bruno, M.; Moore, T.; Nesnow, S.; Ge, Y., Protein carbonyl formation in response to propiconazole-induced oxidative stress. *J Proteome Res* **2009**, 8, (4), 2070-8.
14. Marsano, F.; Boatti, L.; Ranzato, E.; Cavaletto, M.; Magnelli, V.; Dondero, F.; Viarengo, A., Effects of mercury on Dictyostelium discoideum: proteomics reveals the molecular mechanisms of physiological adaptation and toxicity. *J Proteome Res* **2010**, 9, (6), 2839-54.
15. Radfar, A.; Diez, A.; Bautista, J. M., Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant Plasmodium falciparum. *Free Radic Biol Med* **2008**, 44, (12), 2034-42.
16. Sultana, R.; Newman, S. F.; Huang, Q.; Butterfield, D. A., Detection of carbonylated proteins in two-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis separations. *Methods Mol Biol* **2009**, 476, 149-59.

17. Tanou, G.; Job, C.; Belghazi, M.; Molassiotis, A.; Diamantidis, G.; Job, D., Proteomic signatures uncover hydrogen peroxide and nitric oxide cross-talk signaling network in citrus plants. *J Proteome Res* **2010**.
18. Castegna, A.; Aksenov, M.; Aksenova, M.; Thongboonkerd, V.; Klein, J. B.; Pierce, W. M.; Booze, R.; Markesbery, W. R.; Butterfield, D. A., Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med* **2002**, 33, (4), 562-71.
19. Tezel, G.; Yang, X.; Cai, J., Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2005**, 46, (9), 3177-87.
20. Korolainen, M. A.; Goldsteins, G.; Nyman, T. A.; Alafuzoff, I.; Koistinaho, J.; Pirttila, T., Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* **2006**, 27, (1), 42-53.
21. Sultana, R.; Boyd-Kimball, D.; Poon, H. F.; Cai, J.; Pierce, W. M.; Klein, J. B.; Merchant, M.; Markesbery, W. R.; Butterfield, D. A., Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiol Aging* **2006**, 27, (11), 1564-76.
22. Conrad, C. C.; Talent, J. M.; Malakowsky, C. A.; Gracy, R. W., Post-Electrophoretic Identification of Oxidized Proteins. *Biol Proced Online* **2000**, 2, 39-45.
23. Singh, N. R.; Rondeau, P.; Hoareau, L.; Bourdon, E., Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin. *Free Radic Res* **2007**, 41, (10), 1078-88.
24. Fedorova, M.; Kuleva, N.; Hoffmann, R., Identification of cysteine, methionine and tryptophan residues of actin oxidized in vivo during oxidative stress. *J Proteome Res* **2010**, 9, (3), 1598-609.
25. Neuheff, V.; Stamm, R.; Eibl, H., Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie blue dyes in polyacrylamide gels-a systematic analysis. *Electrophoresis* **1985**, 6, 427-448.
26. Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M., Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **1996**, 68, (5), 850-8.
27. Churchward, M. A.; Butt, R. H.; Lang, J. C.; Hsu, K. K.; Coorsen, J. R., Enhanced detergent extraction for analysis of membrane proteomes by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteome Sci* **2005**, 3, (1), 5.
28. Oikawa, S.; Yamada, T.; Minohata, T.; Kobayashi, H.; Furukawa, A.; Tada-Oikawa, S.; Hiraku, Y.; Murata, M.; Kikuchi, M.; Yamashima, T., Proteomic identification of carbonylated proteins in the monkey hippocampus after ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* **2009**, 46, (11), 1472-7.
29. Talent, J. M.; Kong, Y.; Gracy, R. W., A double stain for total and oxidized proteins from two-dimensional fingerprints. *Anal Biochem* **1998**, 263, (1), 31-8.

Oxidative stress responses in cerebral malaria maintain the redox balance in mouse brain

María Linares^{a,b,*}, Patricia Marín-García^{a,b,c,*}, Susana Pérez-Benavente^a,
Antonio Puyet^{a,b}, Amalia Díez^{a,b} and José M. Bautista^{a,b,‡}

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.

^bInstituto de Investigación Hospital 12 de Octubre. Madrid.

^cDepartamento de Ciencias Morfológicas y Biomedicina, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Europea de Madrid, Campus de Villaviciosa de Odón, 28640, Madrid, Spain.

*Both authors have contributed equally; ‡Corresponding Author

e-mails: marialinares@vet.ucm.es; patricia8149@bio.ucm.es; susipz@vet.ucm.es ;
apuyet@vet.ucm.es; adiez@vet.ucm.es; jmbau@vet.ucm.es

Submitted to *Free Radical Biology and Medicine*

ABSTRACT

Oxidative stress has been attributed both a key pathogenetic and rescuing role in cerebral malaria (CM). In a 4-stage *Plasmodium berghei* ANKA murine model of CM, redox signalling and functioning were examined during the course of neurological damage. Host antioxidant defences were early altered at the transcriptional level indicated by the gradually diminished expression of *sod-1*, *sod-2*, *sod-3* and *cat* genes. In disease stage IV, this led to the dysfunctional activity of superoxide dismutase and catalase in damaged brain regions. Vitagene associated markers (*hsp70* and *trx-1*) also showed a decaying expression pattern that paralleled the reduced expression of the transcription factors *park7*, *foxo3* and *xbp1* with a role in preserving brain redox status. However, the oxidative stress markers ROS/RNS were not accumulated in the brains of CM mice and redox proteomics and immunohistochemistry failed to detect quantitative or qualitative differences in protein carbonylation. Thus, the loss of antioxidant capacity was compensated in all cerebral regions by progressive upregulation of *ho-1* from disease stage I to IV, and in specific regions by early *gpx-1* upregulation. Our findings reconcile the apparent inconsistency between the lack of oxidative metabolite build up and reported protective effect of antioxidant therapy against CM.

INTRODUCTION

Malaria is possibly the most serious human tropical disease that affects 5-10% of the world population ¹ and is responsible for some 300 million clinical cases ². Malaria caused by *Plasmodium falciparum* has the highest rates of mortality in children because of its most life-threatening complication cerebral malaria (CM). This is an acute neurological condition characterized by seizures, metabolic acidosis, hypoglycaemia and coma ³. CM has a mortality rate of 10-14% and causes 1-2 million annual deaths among young children predominantly in sub-Saharan Africa and Southeast Asia ⁴, representing some 80% of fatal cases of malaria ⁵. Moreover, child survivors often show long-standing neurocognitive sequelae, particularly in Africa ^{3, 6}.

The precise mechanisms leading to the onset of this neuropathy are unclear but seem to be triggered by several coexisting pathogenic factors including parasite sequestration in the brain microvasculature, an exacerbated host immune response, metabolic dysfunction, hypoxia and a neuroprotection/neurotoxicity imbalance ⁷⁻¹¹. Prior studies have attributed an important role in CM development to an altered redox equilibrium ¹²⁻¹⁵.

Some authors have suggested that reactive oxygen species (ROS), produced by both host and parasite, accumulate during the development of this acute neurological condition promoting oxidative stress ¹²⁻¹⁵. The increased production of free radicals (e.g. superoxide anion and hydroxyl radical) has been observed in activated leucocytes ^{13, 16}, endothelial cells during parasitized red blood cell (pRBC) adhesion ^{12, 17} and, most strikingly, during haemoglobin digestion in the parasite food vacuole ^{13, 18, 19}.

During this latter process, part of the free haem population escapes its crystallisation to haemozoin and is oxidised generating intracellular ROS ^{13, 18, 20}. This, in turn, causes protein oxidation in the parasite and host membranes ^{21, 22}. In addition, increased iron levels in an oxygen-rich environment, such as that of the brain, can further enhance the production of free radicals ²³⁻²⁶.

Indeed, enhanced ROS production during the course of CM is thought to play both a beneficial and pathological role depending on the amount and place of release ^{12, 13}. Beneficial ROS effects contest parasite growth ^{12, 13} whereas prolonged ROS exposure in the host brain tissue damages endothelial cells ^{12-14, 27, 28}, neurons and glia ^{16, 18}. In addition, several antioxidant treatments have shown protection against experimental CM ^{14, 17, 29-31} and prevention of persistent cognitive damage ¹⁴. Notwithstanding, some studies have failed to observe ROS accumulation and oxidative stress during CM ³², questioning the role played by these molecules in the pathogenesis of this disease ¹⁶.

On the other hand, intra and extracellular antioxidant defences exist in the host to prevent oxidative stress, whereby the superoxide radical is reduced by superoxide dismutase (SOD) to hydrogen peroxide. Three types of SOD isoenzymes have been identified in brain: the widely expressed cytosolic Cu/Zn-SOD (SOD-1), mitochondrial Mn-SOD (SOD-2) and copper- and zinc- extracellular SOD (SOD-3) ^{33, 34}. Hydrogen peroxide is reduced to water by both catalase (CAT), a peroxisomal enzyme with a central function in brain cells, and glutathione peroxidase (GPX). Among the eight different mammalian GPX isoforms, cytosolic GPX-1 is essential for brain antioxidative defence ³⁵. Thus, host defence systems impede the transformation of both superoxide radicals and hydrogen peroxide into the very reactive hydroxyl radical, and the reaction between superoxide anion and nitric oxide to form peroxynitrite. These two reactive products rapidly react with lipids, proteins or nucleic acids to produce cell damage ^{12, 13, 27}.

Brain cells overcome oxidative stress through additional antioxidant pathways such as those involving heat shock proteins (HSP), heme oxygenase (HO), and thioredoxin (TRX). Like other HSP, the inducible HSP70 acts as chaperone binding and regulating the activity of other proteins; inducible HO-1 is responsible for detoxifying free haem; and TRX-1, the cytoplasmic TRX isoform widely expressed in brain, cooperates with TRX reductase to reduce disulfide bridges in proteins, detoxify peroxides in concert with peroxyredoxins and TRX reductases and also acts alone as an antioxidant or ROS scavenger ^{36, 37}.

As in other neurological diseases ^{33, 36}, it is postulated that host antioxidant systems fail during the course of CM ¹³. Indeed, the findings of several studies point to the idea that antioxidant systems in the host brain could be involved in the development of CM, although their pathophysiological role is still a matter of debate ^{13, 26, 38, 39}.

In the present study, we examined the state of host antioxidant defences and their role in oxidative damage during the course of CM in a mouse experimental cerebral malaria model (ECM). Here we report the dysfunction of several host antioxidant systems associated with the reduced expression of transcription factors involved in preserving brain host redox status. Oxidative stress markers failed to accumulate in brain regions in parallel with the compensatory induction of two major antioxidant enzymes. Our results reconcile the controversial idea of a lack of oxidative stress build up with the known protective effect of antioxidant therapy against CM.

METHODS

Induction of experimental cerebral malaria and disease assessment

All experiments with animals were conducted at the Universidad Complutense de Madrid in accordance with national and international guidelines for animal care. The study protocol was approved by the Animal Experimentation Committee of the Complutense University.

The experimental mice used were 44 five-week-old male C57BL/6 mice, as a CM susceptible strain. The animals were purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) and housed under standard conditions and supplied with food and water *ad libitum*. The drinking water of infected mice was supplemented with p-amino-benzoic acid. Animals were allowed to accommodate to their new environment for at least 2 days before infection.

In 32 mice, CM was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of 5×10^6 pRBC obtained from *P. berghei* (ANKA) infected mice. Twelve uninfected mice were used as healthy controls. Infection progression was monitored daily by inspection of clinical signs including ruffled fur, abnormal gait, tremor, reduced grip strength, affected startle/touch response, abnormal visual response, reduced motility, head deviation, hemi- or paraplegia, tendency to roll over on stimulation, back elevation, ataxia and convulsions. Parasitaemia was monitored daily (from day 2 post-infection) by microscope counts conducted on thin film blood smears of tail vein blood stained with Wright's eosin methylene blue solution (Merck).

The infected mice developing CM were classified into 4 stages using the method of clustering animals by neurological symptoms as previously described ⁹. After their sacrifice by cervical dislocation, the olfactory bulb, frontal cortex, hippocampus, thalamus-hypothalamus, cerebellum and brainstem were immediately removed.

Mouse antioxidant system and transcription factor expression assays

Total RNA was isolated from the olfactory bulb, hippocampus, frontal cortex, thalamus-hypothalamus, cerebellum and brainstem in control and CM mice using an ABI PRISM® 6100 Nucleic acid Prepstation according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Contaminating DNA was removed using the DNA-free™ Kit (Ambion). Reverse transcriptase (RT) reactions were performed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) at a 1:1 proportion of isolated RNA and RT master mix. The thermal cycling conditions were: 25°C: 10 min, 37°C: 2 h and 85°C: 5 min.

Antioxidant molecules and transcription factor (TF) messenger RNA (mRNA) levels were determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The relative abundance of mouse antioxidant enzymes was assessed by the 5'fluorogenic nuclease assay (TaqMan) of the ABI 7700 Prism Sequence Detector system (Applied Biosystems). In separate PCR reactions, a commercial mixture of mouse specific primers and probes for *sod-1*, *sod-2*, *sod-3*, *gpx-1*, *cat*, *trx-1*, *ho-1*, *hsp70*, Parkinson disease 7 (*park7*), forkhead box O1 (*foxo1*), forkhead box O3 (*foxo3*), X-box binding

protein 1 (*xbp1*) and the house keeping *β-actin* genes (Assays-on-Demand™ Gene Expression products, TaqMan MGB probes) were used, all of which were prepared as a TaqMan PCR master Mix, No Amperase UNG (all from Applied Biosystems).

The specificity of the primers and probes used was verified by basic local alignment search tool (BLAST) analysis, comparing the mouse genes selected to the *Plasmodium berghei* genome and no significant similarity was found. The *β-actin* gene served as an endogenous control to check for any slight variation in the initial concentration, the total RNA quality and the conversion efficiency of the reverse transcription reaction.

PCR reactions were conducted as an initial incubation of 10 min at 95°C for polymerase activation, followed by 40 cycles (melting 15 s at 95°C, annealing and extension 1 min at 60°C) using an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The relative amount of RNA was determined by the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_T}$ method) ⁴⁰. N-fold changes were calculated by expressing the quantity of mRNA for each molecule present in each mouse vs. the mean quantity of mRNA for the molecule detected in control mice.

Western blot analysis

Total tissue protein was extracted from the brainstem of control and CM mice in all stages classified. 10 µg of each protein extract were separated on a 12% sodium dodecyl sulphate (SDS)-acrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes (Protran, Whatman) and then blocked for 1 h using phosphate buffer saline (PBS)-Tween 0.05% solution containing 5% non fat skimmed milk. Next, the commercial polyclonal antibodies anti-SOD-1 (1/2500, Assay designs), anti-CAT (1/5000, GeneTex) or anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) (1/4000, Applied Biosystems) were probed overnight at 4°C. Finally, membranes were incubated 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit-IgG (1/5000) and visualised by the ECL method (Super Signal Substrate Western Blotting kit, Amersham Biosciences).

Chemiluminescence images were quantified by densitometry using Quantity-One 1-D analysis software (Bio-Rad). Relative optical density was calculated as the normalized expression of the enzyme in each mouse relative to the mean value obtained in control mice.

CAT and SOD activity

100 µg of total brainstem and cerebellum protein extract from animals at the most severe stage of CM⁹ were loaded onto a 15 % or 8 % native acrylamide gel (for SOD or CAT activity, respectively) in Tris-glycine running buffer and run at 120V. SOD-1 and 2 were visualized as described previously⁴¹. Briefly, gels were stained with 2,4 mM nitrobluetetrazolium containing 28 µM riboflavin and 28 mM N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) in the dark for 30 min. The gels were then observed under bright fluorescent light and scanned.

Both SOD-1 and 2 enzyme activities were visualized as achromatic bands against a dark background. For CAT activity analysis, following electrophoresis, the gels were stained as previously described^{42, 43} with minor modifications. Briefly, gels were extensively rinsed in deionized water. After a 10 min soak in 0.003% hydrogen peroxide, a staining solution consisting of 1% potassium ferricyanide and ferric chloride was added. Areas of CAT activity appear as clear bands on a blue green background. In both assays, protein loading was determined by Coomassie Brilliant Blue staining. Bands were quantified using Quantity-One 1-D analysis software (Bio-Rad). Relative optical density was calculated as the normalized enzyme activity in each mouse relative to the mean value obtained in control mice.

Reactive oxygen species

Cerebella and brainstems from animals at stage IV of CM⁹ were homogenized in cold phosphate buffer and total reactive oxygen species and/ or reactive nitrogen species (ROS/RNS) contents (including hydrogen peroxide, peroxy radical and peroxy nitrite anion) were determined using the OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Cell Biolabs, INC) following the manufacturer's instructions.

Protein carbonylation

Oxyblot analysis

Cerebella from control and CM at stages III-IV were pooled and homogenized in modified RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8 and 50 mM NaCl, supplemented with detergents: 3% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS); 0.5% (w/v) decanoyl-N-methylglucamide (MEGA 10); 0.5% (w/v) L- α -lysophosphatidylcholine (LPC), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) free protease inhibitor cocktail and butylated hydroxytoluene (BHT)]. Protein was extracted and derivatized before 2D-electrophoresis as previously described ⁴⁴. Derivatized proteins were precipitated using trichloroacetic acid (TCA)-acetone and resuspended in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 0.5% (w/v) MEGA-10, 0.5% (w/v) and 10 mM dithioerythritol.

Proteins were cup-loaded onto immobilized PH gradient (IPG) strips (pH 3-11 NL, 18 cm) that had been previously hydrated overnight in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 1.2%(v/v) DeStreak and 0.5% ampholites, pH 3-11. First-dimensional separation was by isoelectric focusing (IEF) using the IPGphor 3 IEF system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) at 20°C. The voltage was gradually ramped: 3 h 300 V, 6 h 300-1000 V, 3 h 1000-8000 V, and a final step-n-hold at 8000 V for the next 7 h. The run was terminated after ~70.000 V h. The focused strips were equilibrated in equilibration solution (50 mM Tris 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS) containing 1% dithiothreitol reducing agent for 10 min, and transferred to 4% iodoacetamide equilibration solution for a further 10 min. The second-dimension SDS-PAGE was run on homogeneous 12.5% T and 2.6% C casted polyacrylamide gels. Electrophoresis was carried out at 4°C, 2 W overnight using two Hoeffer units.

For each experimental condition (CM or control), 4 gels were run in parallel under identical 2D electrophoresis conditions. Two gels (loaded with 200 μ g of protein/gel) were stained with Sypro Ruby to visualize total proteins and the other two gels (loaded with 40 μ g of protein/gel) were used for subsequent carbonyl

modified protein detection. These two gels prepared for CM and control animals were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes and transfer efficiency was confirmed by: (i) gel staining with Sypro Tangerine before transfer and (ii) membrane staining with Sypro Ruby. Any potential interference of Sypro Tangerine during immunodetection was previously discarded.

Carbonyl groups in the transferred membranes containing derivatized proteins were immunodetected as previously described ⁴⁴ using the anti-2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNP) primary antibody (1/10000 Sigma). Gel and immunoblot images were analyzed using Quantity-One 1-D and PDQuest analysis software (BioRad Laboratories Inc, Munich, Germany). The total amount of protein carbonylation was normalized to total protein content and referred to the mean value obtained in control mice.

Immunohistochemistry

Control and infected mice were sacrificed and whole brains removed and subjected to a cryoprotection process. 10- μ m sagittal sections of brain tissue were cut using a Leica 3050 M cryostat and incubated as described previously ⁴⁵. Briefly, slides were fixed in ethanol:diethylether (1:1 v/v) for 15 min and then reacted with 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) by immersing in 15 mM 2,4-DNPH in absolute ethanol containing 1.5% concentrated sulphuric acid overnight at room temperature. Sections were washed in absolute ethanol containing 1.5% (v/v) concentrated sulphuric acid for 5 min, rehydrated in a graded series of ethanol solutions (95, 70, 50, 30%) for 3 min each, and washed twice in PBS for 5 min.

Endogenous peroxidase was inactivated with 1% hydrogen peroxide for 45 min. Slides were blocked in PBS containing 1% bovine serum albumin, 5% foetal bovine serum and 0.2% TritonX-100 for 1 h and then incubated with anti-2,4-DNP primary antibody (1/200, Sigma) for 1 h at room temperature. Next preparations were incubated in avidin-biotin complex using the Elite Vectastain kit (Vector Laboratories) following the manufacturer's instructions.

Chromogen reactions were performed with diaminobenzidine (Sigma) and 0.003% hydrogen peroxide for 10 min. Finally brain sections were coverslipped with Fluorsave™ Reagent and visualised using a Nikon YS2-H microscope.

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm standard deviation. The Mann Whitney U and Kruskal-Wallis non-parametric tests were used to compare two or more groups respectively. Analyses were performed independently for each molecule and region. All statistical tests were performed using the SPSS 15.0 statistics package. The level of significance was set at a $P \leq 0.05$.

RESULTS

SOD and CAT expression during the clinical course of ECM

During the course of cerebral malaria, ROS may accumulate in the brain as a consequence of vigorous haemoglobin degradation by the parasite, pRBC endothelial adhesion and the host immune response^{12, 13}. Since increased ROS production can affect brain function^{14, 16}, host antioxidant systems are likely to play a major role in ROS detoxification during CM. This action especially involves removal of the superoxide radical and hydrogen peroxide to hinder their transformation into the very reactive hydroxyl or peroxynitrite radicals by reaction between the superoxide anion and nitric oxide^{13, 27}. In this environment, the three SOD isoenzymes reduce the superoxide radical to hydrogen peroxide, which is then reduced to water by CAT³³⁻³⁵.

To examine the roles of these enzymes during cerebral malaria, mRNA expression levels of *sod-1*, *sod-2*, *sod-3* and *cat* genes were determined by qRT-PCR during the course of infection. Transcription levels of all these enzymes were significantly and steadily downregulated until stage IV in all brain regions examined (from 2-6 fold depending on the region), and were most remarkably reduced in the brainstem, olfactory bulb and cerebellum (Figure 1).

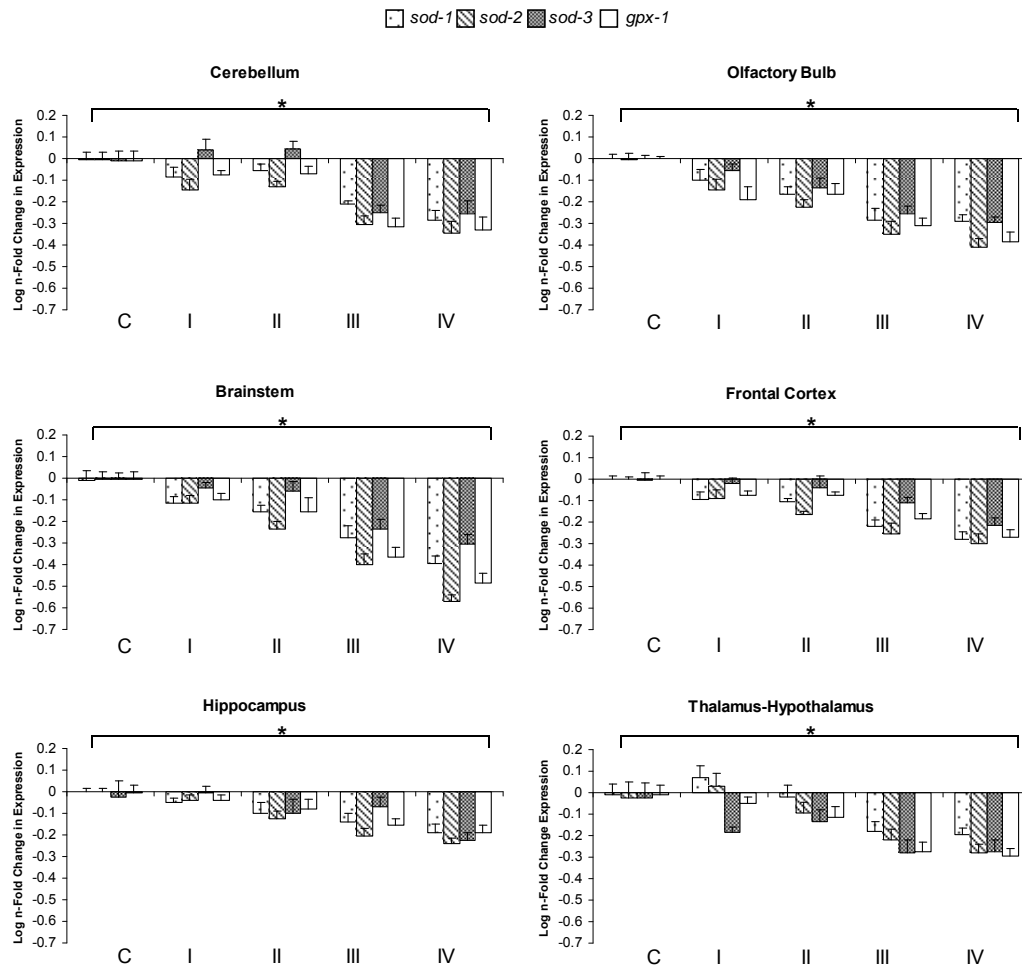


Figure 1.- Expression of *sod* and *cat* mRNA. *sod-1*, *sod-2*, *sod-3* and *cat* mRNA levels in the cerebellum, olfactory bulb, brainstem, frontal cortex, hippocampus and thalamus-hypothalamus detected in control (C) and CM mice at different disease stages (I-IV). Data are the mean \pm standard error of determinations in 5-7 animals. *P* values for significant differences observed in the cerebellum: *sod-1*, *sod-2*, *cat*, $P \leq 0.001$; *sod-3*, $P \leq 0.005$; olfactory bulb: *sod-1*, *sod-2*, *sod-3*, *cat*, $P \leq 0.001$; brainstem: *sod-1*, *sod-2*, *sod-3*, *cat*, $P \leq 0.001$; frontal cortex: *sod-1*, *sod-2*, *cat*, $P \leq 0.001$; *sod-3*, $P \leq 0.005$; hippocampus: *sod-2*, $P \leq 0.001$; *cat*, $P \leq 0.01$; *sod-1*, *sod-3*, $P \leq 0.05$; and thalamus-hypothalamus: *cat*, $P \leq 0.001$; *sod-1*, *sod-2*, $P \leq 0.005$; *sod-3*, $P \leq 0.05$. * $P \leq 0.05$.

According to these results, we then determined the expression of SOD and CAT at the protein level. Being one of the regions most affected by CM ^{9, 46}, the brainstem was analyzed for the protein expression of both SOD and CAT during the course of disease. *Plasmodium berghei* expresses two SOD forms which show 94% and 64% sequence identity with the SOD-2 mouse enzyme. Commercial antibodies raised against mouse SOD-2 showed cross-reactivity with the *P. berghei* SOD protein and revealed the same molecular weight in SDS-electrophoresis (data not shown).

Thus, only the cytosolic Cu/Zn-SOD isoenzyme (SOD-1), which is widely expressed in mammalian brain, was examined by Western blotting. No significant variations were detected in SOD-1 or CAT protein levels in control and CM mice at any stage of disease (Figure 2).

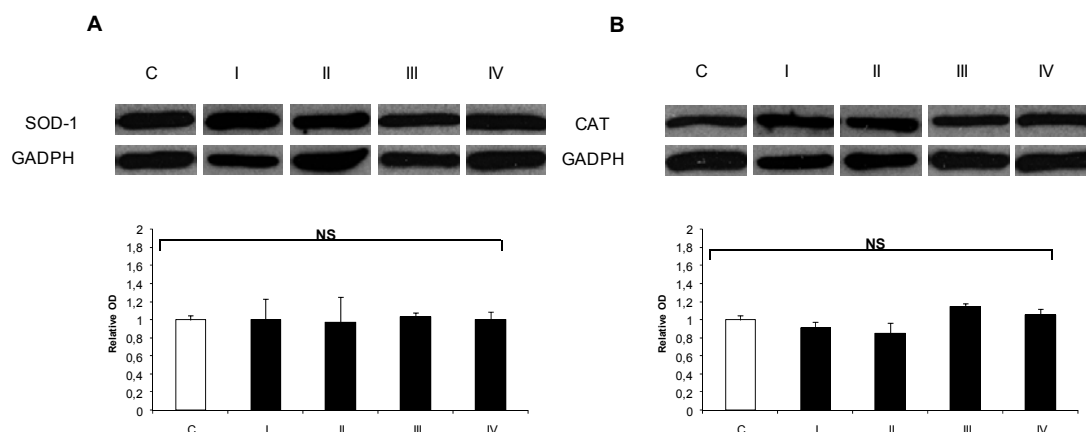


Figure 2.- Expression of SOD and catalase. Western blot analysis of SOD-1 (A) and CAT expression (B) in the brainstems of control (C) and infected mice at different disease stages (I-IV). Anti-GADPH antibody was used to demonstrate equal loading of protein samples. Relative optical density (OD) values given are the mean \pm standard error for determinations in 4 to 7 animals. NS, not significant.

Diminished enzyme activities of SOD and CAT in ECM

The altered turnover of proteins has been recently reported in CM ⁹. Thus, the build up of misfolded proteins could mask gene downregulation at the protein level. The functionality of SOD and CAT proteins was addressed by native gel electrophoresis and differential activity staining in two of the most affected regions, brainstem and cerebellum at the most severe disease stage. Once again, these experiments revealed a band corresponding to parasite SOD at the expected size for mammalian SOD-2 (data not shown). However, despite the possible contribution of parasite SOD activity, both SOD-1 and SOD-2 activities were significantly reduced up to 3-fold in CM stage IV, depending on the brain region examined (Figure 3A). In parallel, CAT activity was reduced up to 1.5-fold (Figure 3B). These findings support the mRNA downregulation observed earlier for the genes encoding these antioxidant enzymes.

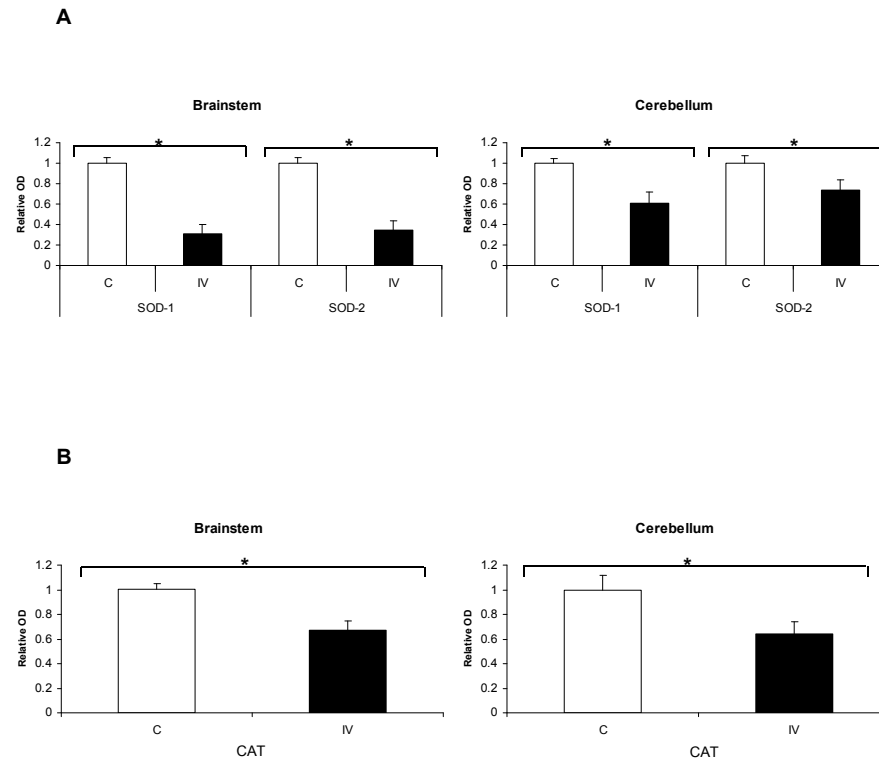


Figure 3.- Activity of SOD and catalase. Activity analysis of SOD-1 and SOD-2 (A) or CAT (B) activities in the brainstem and cerebellum of control (C) and stage IV CM mice. Values given are the mean \pm standard error for 4 to 5 animals. *P* values for significant differences in SOD-1, SOD-2 and CAT activity observed in the brainstem and cerebellum, $P \leq 0.05$. * $P \leq 0.05$.

Expression of *hsp-70* and *trx-1* during the clinical course of ECM

It has been recently proposed that HSP are part of an extended network of stress response genes and cytoprotection genes called the vitagene system, which also includes thioredoxins ³⁶. These molecules not only exert different antioxidant functions but also act as key regulators of essential cell processes ^{37, 47}. Particularly, it has been reported that HSP70 regulates *sod-1* gene expression and the enzyme activities of SOD-1, SOD-2 and CAT ^{48, 49}. Moreover, diminished *hsp70* gene expression leads to the build up of misfolded proteins ³⁶. In this context, we examined possible vitagene system modifications during CM progression by determining *hsp70* and *trx-1* mRNA expression. Thus, *hsp70* mRNA was significantly and gradually downregulated until disease stage IV in all brain regions (from 3 to 6-fold, depending on the region) (Figure 4A) and *trx-1* expression was also downregulated (from 1.5 to 5.0-fold) (Figure 4B), the reduction being significant in all regions except the frontal cortex. The two molecules were mostly downregulated in the brainstem and cerebellum (Figure 4).

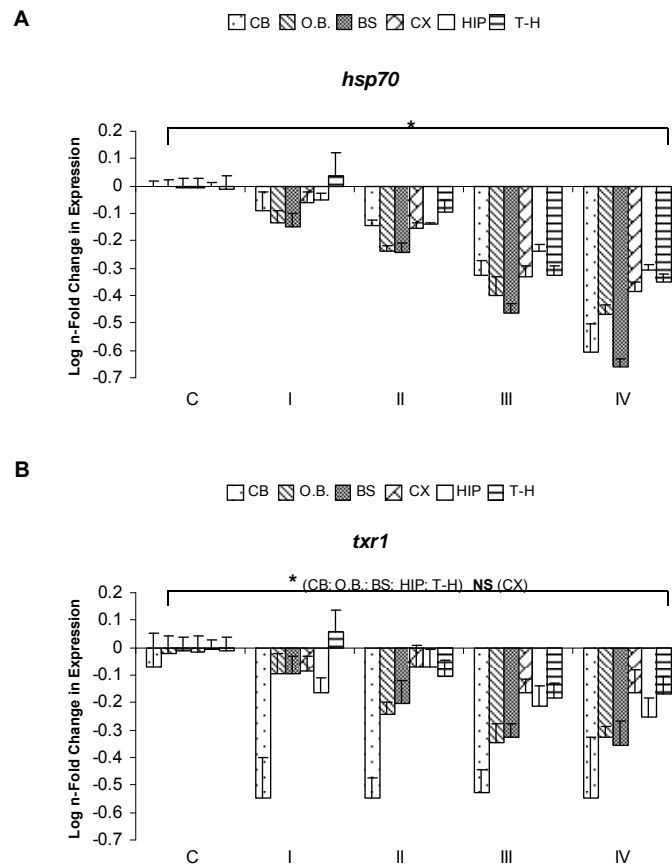


Figure 4.- Expression of *hsp70* and *txr-1* mRNA. Changes in the expression of *hsp70* (A) and *txr-1* (B) mRNA in the cerebellum (CB), olfactory bulb (O.B.), brainstem (BS), frontal cortex (CX), hippocampus (HIP) and thalamus-hypothalamus (T-H) observed in control (C) and CM mice at different disease stages (I-IV). Data are the mean \pm standard error of determinations in 5-7 animals. *P* values for significant differences detected in *hsp70*: in all analyzed regions, $P \leq 0.001$; *txr-1*: in O.B., $P \leq 0.005$; BS, $P \leq 0.01$; CB, HIP, T-H, $P \leq 0.05$. * $P \leq 0.05$. NS (CX).

Expression of transcription factors in brain controlling antioxidant host defences

PARK-7, XBP-1 and the FOXO family of transcription factors regulate the expression of several antioxidant enzyme genes. To investigate the potential role of these TF in the observed downregulation of antioxidant molecules, we examined *park7*, *foxo1*, *foxo3* and *xbp1* mRNA expression. Host brain *park7*, *foxo3* and *xbp1* genes showed significant steady downregulation until stage IV from 1.6 to 5.0-fold depending on the brain region. Again, greatest variation was observed in the cerebellum and brainstem (Figure 5).

The *foxo1* expression pattern varied according to brain region. Thus, besides the significant gradual downregulation observed in the olfactory bulb (up to 2-fold at stage IV), an early up-regulation was observed in the frontal cortex and cerebellum (up to 1 fold at stage II) which then decreased as neurological symptoms progressed (Figure 5). This pattern was only statistically significant for the cortex. Although significant changes were not observed in any other region, a downregulation tendency was observed in the brainstem, hippocampus and thalamus-hypothalamus (up to 1.5-fold at stages III-IV) (Figure 5).

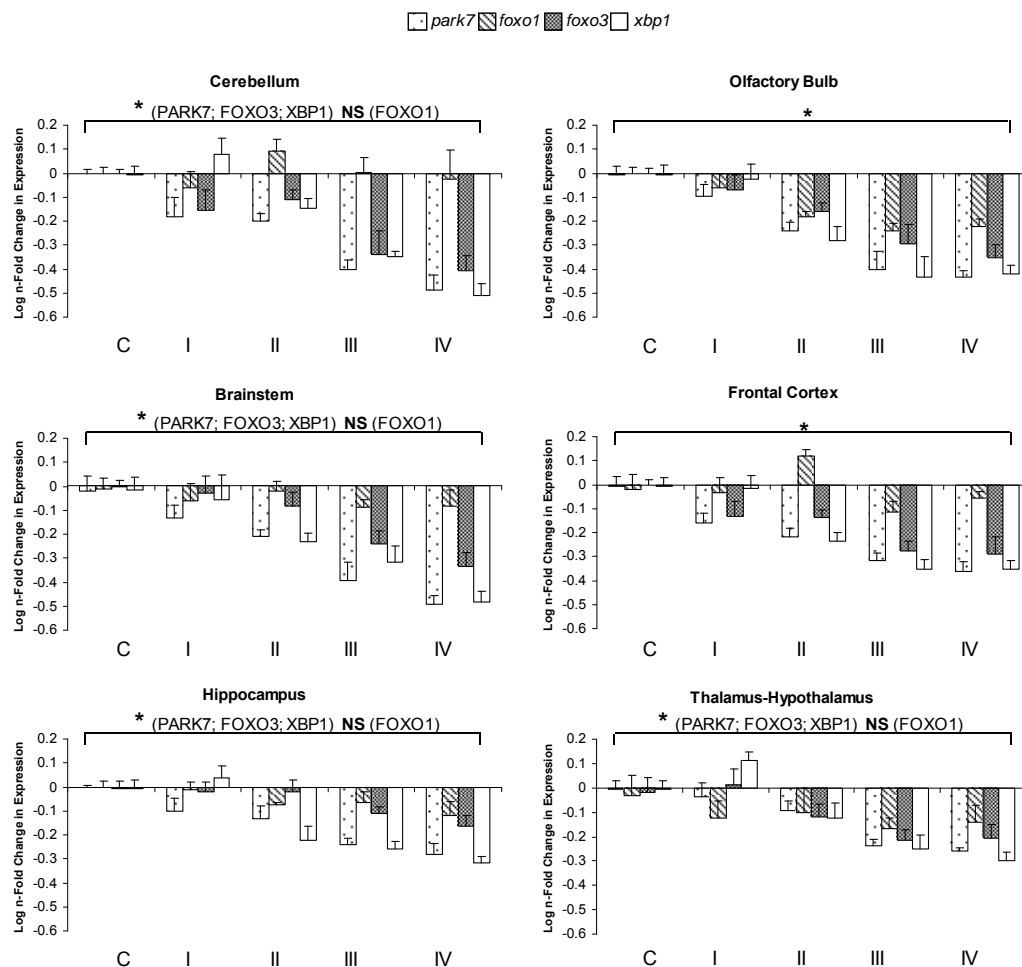


Figure 5.- Expression of *park7*, *foxo1*, *foxo3* and *xbp1* mRNA. Expression of mRNA for *park7*, *foxo1*, *foxo3* and *xbp1* in the cerebellum, olfactory bulb, brainstem, frontal cortex, hippocampus and thalamus-hypothalamus observed in control (C) and CM mice at different CM disease stages (I-IV). Data are the mean \pm standard error of determinations in 5-7 animals. P values for significant differences detected in the cerebellum: *park7*, *xbp1*, $P \leq 0.001$; *foxo3*, $P \leq 0.005$; olfactory bulb: *park7*, *foxo1*, *xbp1*, $P \leq 0.001$; *foxo3*, $P \leq 0.005$; brainstem: *park7*, *xbp1*, $P \leq 0.001$; *foxo3*, $P \leq 0.005$; frontal cortex: *park7*, *xbp1*, $P \leq 0.001$; *foxo3*, $P \leq 0.01$; *foxo1*, $P \leq 0.05$; hippocampus: *xbp1*, $P \leq 0.001$; *park7*, $P \leq 0.005$; *foxo3*, $P \leq 0.05$; and thalamus-hypothalamus: *park7*, *xbp1*, $P \leq 0.001$; *foxo3*, $P \leq 0.05$. * $P \leq 0.05$; NS, not significant.

ROS/RNS production and protein carbonylation are not elevated in CM

To determine if the altered levels of antioxidant enzymes observed could lead to higher ROS production and intracellular oxidative stress, we quantified reactive oxygen and/or nitrogen species and protein oxidation. ROS/RNS production (including the catalase substrate, hydrogen peroxide and the superoxide by-product, peroxynitrite anion) was evaluated in the two most affected regions, brainstem and cerebellum, at the most severe stage of infection (stage IV). However, no significant differences were observed between CM mice and uninfected animals (Figure 6).

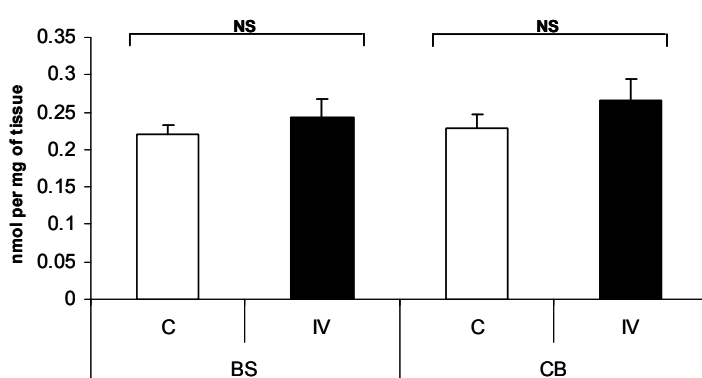


Figure 6.- ROS/RNS levels. ROS/RNS levels detected in control mice (C) and infected mice at disease stage IV (IV) in the brainstem (BS) and cerebellum (CB). Data are the mean \pm standard error of determinations made in 3-5 animals calculated as nmol of ROS/RNS normalized to each milligram of tissue in each animal. NS, not significant.

Protein carbonylation is one of the most common oxidation markers in biological systems. We thus explored the carbonyl contents of individual proteins and the distribution pattern of protein carbonyls in the brains of CM mice at the most severe disease stages by 2D oxyblot and immunohistochemical analyses. Similar 2D oxyblot patterns and spot numbers were observed for cerebellum specimens obtained from CM or uninfected mice (Figure 7A). Thus, between technical replicates control mice showed 69 common spots and CM samples yielded 53 common spots. More than 90% of these CM spots were also present among the spots to control mice. According to this analysis, it can be considered that protein carbonylation in brain did not vary significantly between infected and uninfected mice (Figure 7B). To confirm this, protein carbonylation distribution patterns were investigated by immunolabelling carbonyl groups in all analyzed regions and again no differences were observed between experimental and control animals (Figure 7C).

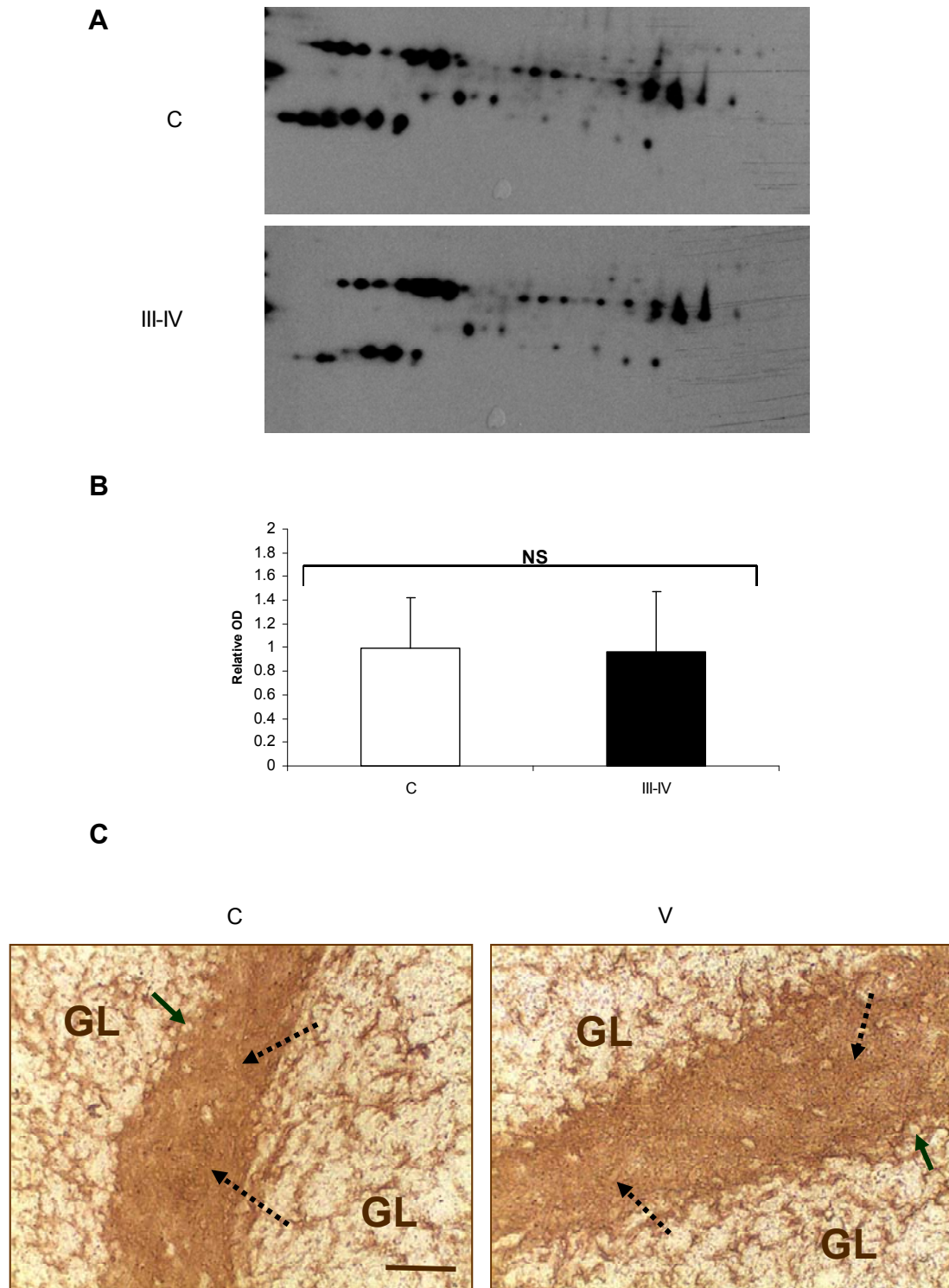


Figure 7.- Carbonyl modified proteins detected by Western blotting. Oxyblot images (A) and total carbonyl modified proteins (B) for cerebellum specimens obtained from control (C) or infected mice at disease stages III and IV (III-IV). Images are representative of two independent experiments. Relative optical density (OD) values given are the mean \pm standard error of two independent experiments using a pool of 2-3 different animals. NS, not significant. C: Immunohistochemical distribution profiles of protein carbonylation in brain slices prepared from control (C) and stage IV CM mice (IV). Images show the localization of carbonyl modified proteins in the cerebellum.

Upregulation of *ho-1* and *gpx-1* during the clinical course of ECM

The lack of correlation between the diminished functionality of the antioxidant systems analyzed and oxidative stress production suggests the compensatory antioxidant activity of other antioxidant systems. Since *ho-1* upregulation is modulated by inflammatory cytokines induced during CM^{16, 50} and GPX could compensate the partial lack of peroxide detoxification by CAT and TXR, we then examined the corresponding mRNA expression level of *ho-1* and *gpx-1* genes during CM progression.

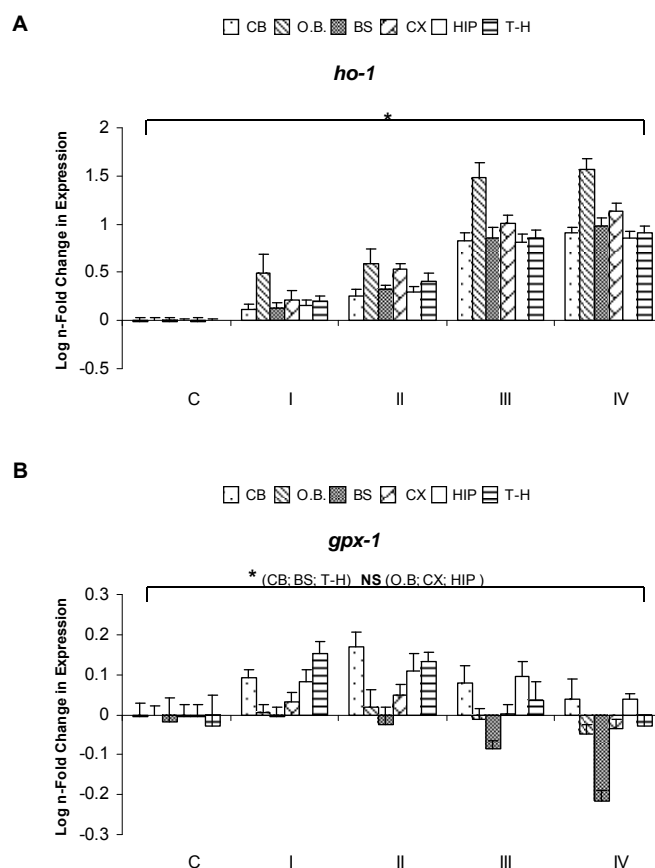


Figure 8.- Expression of *ho-1* and *gpx-1* mRNA. mRNA expression of heme oxygenase (A) and glutathione peroxidase (B) in the cerebellum (CB), olfactory bulb (O.B.), brainstem (BS), frontal cortex (CX), hippocampus (HIP) and thalamus-hypothalamus (T-H) detected in control mice (C) and CM mice at different disease stages (I-IV). Data are the mean \pm standard error of determinations in 5-7 animals. *P* values for significant differences detected in *ho-1*: in all analyzed regions, $P \leq 0.001$; and *gpx-1*: in BS, $P \leq 0.005$; CB, T-H, $P \leq 0.05$. * $P \leq 0.05$; NS, not significant.

Remarkably, *ho-1* mRNA expression was progressively and significantly upregulated from disease stage 0 (controls) to IV by 8 to 15-fold depending on the brain area. Greatest expression was observed in the olfactory bulb, frontal cortex and brainstem (Figure 8A). In contrast, the *gpx-1* expression pattern was not homogeneous across all brain regions. Thus, although significant downregulation was detected in the brainstem (up to 2-fold at stage IV), an early up-regulation was observed in most brain areas (up to 2-fold, depending on the region), and significantly higher *gpx-1* mRNA levels were detected in the cerebellum and thalamus-hypothalamus. Greatest increases were observed at stage II (cerebellum, frontal cortex and hippocampus) or stage I (thalamus-hypothalamus) since expression levels fell in later disease stages (Figure 8B).

DISCUSSION

A known feature of malaria infection is that it causes oxidative stress in pRBC as a consequence of the parasite's metabolism and the host response^{11, 18, 20}. However, the generation of local oxidative stress factors during cerebral malaria is still a matter of debate. Some authors suggest that ROS accumulation promotes oxidative stress¹²⁻¹⁵ whereas others have failed to detect any markers of oxidative stress in this disease³².

Further, there is no general consensus as to the precise role played by oxidative stress in cerebral malaria. Although it could combat parasites and is essential for maintaining host homeostasis, oxidative stress could also activate signal transduction pathways and cause cell damage in the brain, both of which will significantly impact the pathophysiology and progression of CM^{12, 13, 27, 28, 51}. Mechanistically, many of these effects of oxidative stress involve the activation of specific transcription factors to control the expression of target genes mediating responses against this stress⁵¹. On the other hand, several studies have demonstrated the protective effects of antioxidants in the neurological and cognitive alterations produced during murine cerebral malaria^{14, 17, 29-31}, suggesting the failure of host antioxidant mechanisms during CM¹³.

To address the oxidative stress status of the infected host brain and its implications in the neurocognitive damage produced by cerebral malaria, we examined a broad set of oxidative stress markers and antioxidant defence systems in host brain regions during the course of experimental CM. The unfeasibility of analysing the time-course of the clinical and molecular events that take place during human CM has determined a need to rely on experimental murine models of cerebral malaria ⁵². The *P. berghei* (ANKA) model of infection in 4-5 week-old C57BL/6 mice has been the most frequently used model because of its similarities with most of the pathophysiological features of human CM ^{5, 53-55}. Since clinical symptoms during the course of experimental CM vary between individuals ^{53, 56, 57}, animals were classified accordingly to the onset time of given neurological symptoms, as previously described ⁹.

In this experimental setting, we observed the functional failure of host antioxidant defence system at the level of superoxide dismutase and catalase enzyme activities in brain. Moreover, at the mRNA level, the gradually reduced expression of the three *sod* isoenzyme and *cat* genes was seen to parallel the progression of neurological symptoms.

Altered expression levels and the diminished activity of these enzymes has been reported in other neurological disorders ^{33, 58}. Further, low CAT levels have also been detected in human malaria patients and murine pRBC while diminished SOD activity has been reported in *P. falciparum* pRBC ¹⁸. Abnormalities in the activities of these antioxidant enzymes have been suggested to cause neuronal cell death ⁵⁸. SOD regulates several genes and proteins involved in apoptosis ³³ and both SOD and catalase mediate neuroprotective effects ^{33, 59, 60}. Thus, treatment with SOD and CAT can prevent cell damage *in vivo* ¹³. Further, SOD supplementation *in vitro* reduces the oxidative stress induced by the parasite ^{12, 17, 61}. In experimental mouse models, treatment with SOD or CAT prolongs survival or prevents CM ^{13, 17, 33}.

During the pathogenesis of CM, the cytosolic form of SOD (SOD-1), besides preventing oxidative stress and upregulating the host's antioxidant armature to enhance the activity of other antioxidants such as catalase, could also increase anti-inflammatory actions and induce nitric oxide production. The latter reduces the

adhesion of pRBC by ICAM-1 downregulation and exerts anti-plasmodial effects ^{12, 17}. Because of all these functions, even moderate reductions in SOD-1 could have important functional consequences ⁶².

Changes in SOD and CAT were not observed at the protein level. A plausible explanation is the dysfunction of the ubiquitin-proteasome, as proposed by others ^{9, 63}. Misfolded aggregates of proteins have been demonstrated in other neurological diseases ³³. In this context, the diminished expression of the antioxidant *hsp70* gene observed here during CM progression could also contribute to the build up of misfolded proteins, since HSP prevent protein misfolding and aggregation after a variety of central nervous system insults such as oxidative stress ^{36, 47}. Reduced SOD-1 and SOD-2 activities have been observed in *hsp70* knockout mice ⁴⁸. HSP-70 might also modulate the cell response to toxic insult by increasing CAT activity ⁴⁹. Thus, the SOD and CAT alterations detected in this study could be explained, at least in part, by the *hsp70* downregulation observed during CM progression. HSP also play a role in neuroprotection through an array of pro-survival effects ^{47, 48} such as apoptotic signalling inhibition and inflammatory damage prevention by downregulating pro-inflammatory cytokines, which could also be responsible for cerebral damage during CM.

In parallel with *cat*, *sod* and *hsp70* downregulation, the expression of *txr-1*, another component of the host antioxidant defence system, was also reduced during CM progression. Diminished TRX-1 levels have been observed in the brains of patients with Alzheimer's disease ³⁷ and their upregulation has been linked to neuron survival following injury ³⁶. Thus, TRX-1 promotes brain regeneration and neuroprotection in the normal brain and its deficiency could lead to the neurodegeneration produced in CM. The beneficial effects of TRX-1 could be attributed to its ability to enhance ROS detoxification and/or modulate signalling functions ³⁷.

These observed changes could explain why antioxidants protect against CM ^{14, 17, 29-31} and suggest the use of these antioxidant molecules as complementary therapeutic agents for the management of cerebral malaria and to reduce its neurological sequelae.

In the last 20 years, a number of transcription factors that mediate critical transcription responses to oxidative stress have been identified ⁵¹. Thus, PARK7, XBP1 and the FOXO family of transcription factors regulate several antioxidant related genes ^{51, 64, 65}. In our study, the expression of *foxo3*, *xbp1* and *park7* was downregulated in all the brain regions and, in general, *foxo1* also showed this tendency. Therefore, the mechanism underlying reduced antioxidant gene expression during CM appears to be related to a decline in these TF.

Diminished *foxo* expression has been described to lower *sod-2* and *cat* expression ^{51, 66} and *xbp1* knockdown has been found to decrease *cat*, *sod-1* and *trx-1* expression. As these molecules are not direct targets of XBP-1, these genes are probably regulated indirectly by this TF. Among these antioxidant genes, that encoding catalase appears to be especially crucial, since its expression has been closely linked to XBP1 ⁶⁴. In addition, XBP1 also regulates genes involved in protein folding ⁶⁷. PARK7 is a regulator of antioxidant transcription responses that could act as an antioxidant protein and a molecular chaperone to inhibit aggregates in Parkinson's disease ⁶⁸. Moreover, it can also upregulate *hsp70* to block protein aggregation in this disease ^{65, 69}. Recently, it has been shown that PARK7 mediates cytosolic SOD-1 activation ⁷⁰.

Uncontrolled oxidative stress could damage host antioxidant defences ¹³. Peroxynitrite inhibits the function of SOD ³³. Hence, we examined ROS production and protein carbonylation, as markers of oxidative stress. Oxidative stress has been observed both in *P. falciparum* and *P. berghei* pRBC ^{13, 21, 22}. The endothelial cells of mice suffering ECM show oxidative DNA damage ¹⁵. In addition, cerebral malaria causes lipid peroxidation to a greater extent in human cerebrospinal fluid ⁷¹ than in mouse brain ¹⁴. However, we were unable to detect differences in the accumulation of ROS in mice brain with severe stage CM and uninfected controls. ROS rapidly react with proteins causing carbonylation. Carbonyl groups are excellent markers of intracellular oxidative stress because they are the final byproducts of multiple oxidation pathways that occur within the cell ⁷². However, neither total carbonylated proteins nor the number of individual carbonylated proteins in CM mice differed from those detected in control mice. The lack of alterations in total protein carbonyl contents in CM has been reported ³², and along with our results

suggests that ROS overproduction, if present, is well controlled in ECM and plays no major role in its pathogenesis. Given the oxidative modification of proteins predisposes them to proteolysis, some increased protein carbonylation might not be readily detected ^{32, 73}.

On the other hand, local ROS production ⁷⁴ can be masked when analysing whole regions ³². It should be emphasized that according to our results, different antioxidant levels exist in different brain locations, in agreement with the findings of others ³³. Thus, the lack of changes in the protein carbonylation distribution patterns in all the brain regions analyzed suggests that protein carbonylation cannot be used as a specific brain marker of cerebral malaria, probably due to an adaptation effect in all regions, independently of expression level differences in antioxidant defence genes.

Among the differences in local antioxidant responses observed in the present study, the brainstem and cerebellum were the most affected regions, as previously detected for other dysfunctional factors ^{9, 57, 75, 76}. Alterations in these specific regions could explain some of CM's symptoms and sequelae, such as ataxia and impaired movement and balance ^{3, 6, 46, 76, 77}.

Globally, our results could also be explained by the compensatory induction of *ho-1* and *gpx-1* genes in several brain regions. HO-1 production is one of the earlier cellular responses to tissue damage ³⁶. Bilirubin, one of the final products of haem degradation by HO-1, protects against the cytotoxic effects of the strong oxidants hydrogen peroxide and peroxynitrite ^{25, 36}. Carbon monoxide, another by-product of the actions of HO-1, limits the production of free haem, exerts anti-inflammatory actions ²⁵ and suppresses the pathogenesis of cerebral malaria in mice ²⁶. Increased levels of HO-1 have also been observed in other neurological diseases ³⁶ but expression levels of this molecule determined in the brains of CM patients and mice have been inconsistent ^{16, 24, 26, 38, 78}. In humans, HO-1 has been detected in CM, but in some reports it is only observed in some patients and is not specific of CM ^{16, 38, 78}. In mice, HO-1 shows a protective effect against ECM ^{24, 26, 79} and its elevated expression has been observed in moribund CM mice ⁸⁰. *ho-1* expression could be induced by several factors such as free haem and cytokines ¹⁶, which are early

induced in ECM⁹. GPX reduces hydrogen peroxide and organic hydroperoxides. As mentioned above, *xbp1* deletion reduces several antioxidant enzymes but not *gpx* expression⁶⁴, supporting the different *gpx-1* expression pattern observed in our ECM model. Elevated GPX activity has been observed in other neurological diseases such as Alzheimer's³⁶ but, until now, its induction in CM had not been described.

In conclusion, although we were unable to detect the build up of oxidative stress metabolites, a central role of antioxidant systems during the advance of cerebral malaria could not be excluded. The changes observed in these systems during the course of CM open new perspectives for the treatment of this disease. The pharmacological or nutritional manipulation of endogenous cellular defence mechanisms is an innovative approach to therapeutic intervention³⁶. In this context, the recently reported protective effect of curcumin against ECM⁸¹ could be mediated by inducing the heat-shock response coupled to other antioxidant activities³⁶. Finally, our results also help reconcile the ongoing controversy over the lack of build up of oxidative stress metabolites during CM and the protective effects of some antioxidants against this devastating disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (BIO2006-12355 and BIO2007-67885) and by the Research Teams Consolidation Programme of the UCM (Research Team 920267-Comunidad de Madrid). M.L. holds a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (AP20061576). We are particularly indebted to Dr. Montserrat Martínez-Gomariz and Marisol Fernández from the Proteomics Facilities UCM-PCM and CNB-PCM and which are components of the ProteoRed Network. We thank Ana Burton for reviewing the English and commenting on the manuscript.

LIST OF ABBREVIATIONS

2,4-DNP: 2,4-dinitrophenylhydrazone
2,4-DNPH: 2,4-dinitrophenylhydrazine
BHT: butylated hydroxytoluene
BLAST: basic local alignment tool
CAT: catalase
CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CM: cerebral malaria
ECM: experimental cerebral malaria
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
FOXO1: forkhead box O1
FOXO3: forkhead box O3
GADPH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPX: glutathione peroxidase
HO: heme oxygenase
HSP: heat shock protein
IEF, isoelectric focusing
LPC: L- α -lysophosphatidylcholine
IPG: immobilized PH gradient
MEGA 10: decanoyl-N-methylglucamide
mRNA: messenger RNA
PARK7: Parkinson disease 7
PBS: phosphate buffer saline
pRBC: parasitized red blood cells
PVDF: polyvinylidene fluoride
qRT-PCR: quantitative reverse transcriptase-PCR
RNS: reactive nitrogen species
ROS: reactive oxygen species
RT: reverse transcriptase
SDS: sodium dodecyl sulphate
SOD: superoxide dismutase
TCA: trichloroacetic acid
TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

TF: transcription factor

TRX: thioredoxin

XBP1: X-box binding protein 1

Gene names appear as low-case italics of the corresponding protein abbreviations specified above.

REFERENCES

1. Schofield, L.; Grau, G. E., Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature reviews* **2005**, 5, (9), 722-35.
2. WHO World Malaria Report. World Health Organization. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf.
3. Idro, R.; Marsh, K.; John, C. C.; Newton, C. R., Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatr Res* **2010**, 68, (4), 267-74.
4. Armah, H. B.; Wilson, N. O.; Sarfo, B. Y.; Powell, M. D.; Bond, V. C.; Anderson, W.; Adjei, A. A.; Gyasi, R. K.; Tettey, Y.; Wiredu, E. K.; Tongren, J. E.; Udhayakumar, V.; Stiles, J. K., Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malaria journal* **2007**, 6, 147.
5. Lou, J.; Lucas, R.; Grau, G. E., Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clinical microbiology reviews* **2001**, 14, (4), 810-20, table of contents.
6. Idro, R.; Kakooza-Mwesige, A.; Balyejjussa, S.; Mirembe, G.; Mugasha, C.; Tugumisirize, J.; Byarugaba, J., Severe neurological sequelae and behaviour problems after cerebral malaria in Ugandan children. *BMC Res Notes* **2010**, 3, 104.
7. Combes, V.; Coltel, N.; Faille, D.; Wassmer, S. C.; Grau, G. E., Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. *International journal for parasitology* **2006**, 36, (5), 541-6.
8. Delahaye, N. F.; Coltel, N.; Puthier, D.; Barbier, M.; Benech, P.; Joly, F.; Iraqi, F. A.; Grau, G. E.; Nguyen, C.; Rihet, P., Gene expression analysis reveals early changes in several molecular pathways in cerebral malaria-susceptible mice versus cerebral malaria-resistant mice. *BMC genomics* **2007**, 8, 452.
9. Linares, M.; Marín-García, P.; Pérez-Benavente, S.; Puyet, A.; Bautista, J. M.; Diez, A., Declined expression of brain-derived neurotrophic factor correlates with neurological stages of cerebral malaria in mice. *Submitted for publication* **2011**.
10. Medana, I. M.; Day, N. P.; Hien, T. T.; Mai, N. T.; Bethell, D.; Phu, N. H.; Farrar, J.; Esiri, M. M.; White, N. J.; Turner, G. D., Axonal injury in cerebral malaria. *The American journal of pathology* **2002**, 160, (2), 655-66.

11. van der Heyde, H. C.; Nolan, J.; Combes, V.; Gramaglia, I.; Grau, G. E., A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends in parasitology* **2006**, 22, (11), 503-8.
12. Pino, P.; Taoufiq, Z.; Nitcheu, J.; Vouldoukis, I.; Mazier, D., Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thrombosis and haemostasis* **2005**, 94, (2), 336-40.
13. Postma, N. S.; Mommers, E. C.; Eling, W. M.; Zuidema, J., Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. *Pharm World Sci* **1996**, 18, (4), 121-9.
14. Reis, P. A.; Comim, C. M.; Hermani, F.; Silva, B.; Barichello, T.; Portella, A. C.; Gomes, F. C.; Sab, I. M.; Frutuoso, V. S.; Oliveira, M. F.; Bozza, P. T.; Bozza, F. A.; Dal-Pizzol, F.; Zimmerman, G. A.; Quevedo, J.; Castro-Faria-Neto, H. C., Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *PLoS pathogens* **2010**, 6, (6), e1000963.
15. Wiese, L.; Kurtzhals, J. A.; Penkowa, M., Neuronal apoptosis, metallothionein expression and proinflammatory responses during cerebral malaria in mice. *Experimental neurology* **2006**, 200, (1), 216-26.
16. Hunt, N. H.; Golenser, J.; Chan-Ling, T.; Parekh, S.; Rae, C.; Potter, S.; Medana, I. M.; Miu, J.; Ball, H. J., Immunopathogenesis of cerebral malaria. *International journal for parasitology* **2006**, 36, (5), 569-82.
17. Taoufiq, Z.; Pino, P.; Dugas, N.; Conti, M.; Tefit, M.; Mazier, D.; Vouldoukis, I., Transient supplementation of superoxide dismutase protects endothelial cells against Plasmodium falciparum-induced oxidative stress. *Molecular and biochemical parasitology* **2006**, 150, (2), 166-73.
18. Becker, K.; Tilley, L.; Vennerstrom, J. L.; Roberts, D.; Rogerson, S.; Ginsburg, H., Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International journal for parasitology* **2004**, 34, (2), 163-89.
19. Kumar, S.; Guha, M.; Choubey, V.; Maity, P.; Srivastava, K.; Puri, S. K.; Bandyopadhyay, U., Bilirubin inhibits Plasmodium falciparum growth through the generation of reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* **2008**, 44, (4), 602-13.
20. Muller, S., Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Molecular microbiology* **2004**, 53, (5), 1291-305.
21. Mendez, D.; Linares, M.; Diez, A.; Puyet, A.; Bautista, J. M., Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon Plasmodium falciparum invasion are differentially carbonylated in G6PD A(-) deficiency. *Free radical biology & medicine* **2011**, 50, 1305-13.
22. Radfar, A.; Diez, A.; Bautista, J. M., Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant Plasmodium falciparum. *Free radical biology & medicine* **2008**, 44, (12), 2034-42.
23. Butterfield, D. A.; Reed, T.; Newman, S. F.; Sultana, R., Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free radical biology & medicine* **2007**, 43, (5), 658-77.
24. Ferreira, A.; Balla, J.; Jeney, V.; Balla, G.; Soares, M. P., A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med* **2008**, 86, (10), 1097-111.

25. Hunt, N. H.; Stocker, R., Heme moves to center stage in cerebral malaria. *Nature medicine* **2007**, 13, (6), 667-9.
26. Pamplona, A.; Ferreira, A.; Balla, J.; Jeney, V.; Balla, G.; Epiphany, S.; Chora, A.; Rodrigues, C. D.; Gregoire, I. P.; Cunha-Rodrigues, M.; Portugal, S.; Soares, M. P.; Mota, M. M., Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nature medicine* **2007**, 13, (6), 703-10.
27. Pino, P.; Vouldoukis, I.; Dugas, N.; Hassani-Loppion, G.; Dugas, B.; Mazier, D., Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2003**, 1010, 582-6.
28. Pongponratn, E.; Turner, G. D.; Day, N. P.; Phu, N. H.; Simpson, J. A.; Stepniewska, K.; Mai, N. T.; Viriyavejakul, P.; Looareesuwan, S.; Hien, T. T.; Ferguson, D. J.; White, N. J., An ultrastructural study of the brain in fatal Plasmodium falciparum malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **2003**, 69, (4), 345-59.
29. Kremsner, P. G.; Grundmann, H.; Neifer, S.; Sliwa, K.; Sahlmuller, G.; Hegenscheid, B.; Bienzle, U., Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. *The Journal of infectious diseases* **1991**, 164, (3), 605-8.
30. Thumwood, C. M.; Hunt, N. H.; Cowden, W. B.; Clark, I. A., Antioxidants can prevent cerebral malaria in Plasmodium berghei-infected mice. *Br J Exp Pathol* **1989**, 70, (3), 293-303.
31. Vouldoukis, I.; Lacan, D.; Kamate, C.; Coste, P.; Calenda, A.; Mazier, D.; Conti, M.; Dugas, B., Antioxidant and anti-inflammatory properties of a Cucumis melo LC. extract rich in superoxide dismutase activity. *J Ethnopharmacol* **2004**, 94, (1), 67-75.
32. Sanni, L. A.; Fu, S.; Dean, R. T.; Bloomfield, G.; Stocker, R.; Chaudhri, G.; Dinuer, M. C.; Hunt, N. H., Are reactive oxygen species involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? *The Journal of infectious diseases* **1999**, 179, (1), 217-22.
33. Maier, C. M.; Chan, P. H., Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* **2002**, 8, (4), 323-34.
34. Ookawara, T.; Imazeki, N.; Matsubara, O.; Kizaki, T.; Oh-Ishi, S.; Nakao, C.; Sato, Y.; Ohno, H., Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol* **1998**, 275, (3 Pt 1), C840-7.
35. Dringen, R.; Pawlowski, P. G.; Hirrlinger, J., Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* **2005**, 79, (1-2), 157-65.
36. Calabrese, V.; Guagliano, E.; Sapienza, M.; Panebianco, M.; Calafato, S.; Puleo, E.; Pennisi, G.; Mancuso, C.; Butterfield, D. A.; Stella, A. G., Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochem Res* **2007**, 32, (4-5), 757-73.
37. Patenaude, A.; Murthy, M. R.; Mirault, M. E., Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* **2005**, 62, (10), 1063-80.
38. Medana, I. M.; Mai, N. T.; Day, N. P.; Hien, T. T.; Bethell, D.; Phu, N. H.; Farrar, J.; White, N. J.; Turner, G. D., Cellular stress and injury responses in the brains of adult Vietnamese patients with fatal Plasmodium falciparum malaria. *Neuropathology and applied neurobiology* **2001**, 27, (6), 421-33.
39. Takeda, M.; Kikuchi, M.; Ubalee, R.; Na-Bangchang, K.; Ruangweerayut, R.; Shibahara, S.; Imai, S.; Hirayama, K., Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. *Jpn J Infect Dis* **2005**, 58, (5), 268-71.

40. Livak, K. J.; Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* **2001**, 25, (4), 402-8.
41. Li, M.; Chiu, J. F.; Mossman, B. T.; Fukagawa, N. K., Down-regulation of manganese-superoxide dismutase through phosphorylation of FOXO3a by Akt in explanted vascular smooth muscle cells from old rats. *The Journal of biological chemistry* **2006**, 281, (52), 40429-39.
42. O'Malley, Y. Q.; Reszka, K. J.; Rasmussen, G. T.; Abdalla, M. Y.; Denning, G. M.; Britigan, B. E., The Pseudomonas secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2003**, 285, (5), L1077-86.
43. Sun, Y.; Elwell, J. H.; Oberley, L. W., A simultaneous visualization of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase on polyacrylamide gels. *Free Radic Res Commun* **1988**, 5, (2), 67-75.
44. Linares, M.; Marin-Garcia, P.; Mendez, D.; Puyet, A.; Diez, A.; Bautista, J. M., Proteomic Approaches to Identifying Carbonylated Proteins in Brain Tissue. *Journal of proteome research* **2011**, 10, (4), 1719-1727.
45. Frank, J.; Pompella, A.; Biesalski, H. K., Immunohistochemical detection of protein oxidation. *Methods Mol Biol* **2002**, 196, 35-40.
46. Idro, R.; Jenkins, N. E.; Newton, C. R., Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet neurology* **2005**, 4, (12), 827-40.
47. Giffard, R. G.; Han, R. Q.; Emery, J. F.; Duan, M.; Pittet, J. F., Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70. *Anesthesiology* **2008**, 109, (2), 339-48.
48. Choi, S.; Park, K. A.; Lee, H. J.; Park, M. S.; Lee, J. H.; Park, K. C.; Kim, M.; Lee, S. H.; Seo, J. S.; Yoon, B. W., Expression of Cu/Zn SOD protein is suppressed in hsp 70.1 knockout mice. *J Biochem Mol Biol* **2005**, 38, (1), 111-4.
49. Romero, C.; Benedi, J.; Villar, A.; Martin-Aragon, S., Involvement of Hsp70, a stress protein, in the resistance of long-term culture of PC12 cells against sodium nitroprusside (SNP)-induced cell death. *Arch Toxicol* **2010**, 84, (9), 699-708.
50. Poss, K. D.; Tonegawa, S., Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94, (20), 10919-24.
51. Ma, Q., Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther* **2010**, 125, (3), 376-93.
52. Rest, J. R., Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1982**, 76, (3), 410-5.
53. Brian de Souza, J.; Hafalla, J. C.; Riley, E. M.; Couper, K. N., Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* **2009**, 1-18.
54. Medana, I. M.; Turner, G. D., Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *International journal for parasitology* **2006**, 36, (5), 555-68.
55. Pierrot, C.; Adam, E.; Lafitte, S.; Godin, C.; Dive, D.; Capron, M.; Khalife, J., Age-related susceptibility and resistance to Plasmodium berghei in mice and rats. *Experimental parasitology* **2003**, 104, (1-2), 81-5.

56. Amante, F. H.; Stanley, A. C.; Randall, L. M.; Zhou, Y.; Haque, A.; McSweeney, K.; Waters, A. P.; Janse, C. J.; Good, M. F.; Hill, G. R.; Engwerda, C. R., A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *The American journal of pathology* **2007**, 171, (2), 548-59.
57. Lackner, P.; Beer, R.; Heussler, V.; Goebel, G.; Rudzki, D.; Helbok, R.; Tannich, E.; Schmutzhard, E., Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathology and applied neurobiology* **2006**, 32, (2), 177-88.
58. Marcus, D. L.; Thomas, C.; Rodriguez, C.; Simberkoff, K.; Tsai, J. S.; Strafaci, J. A.; Freedman, M. L., Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Experimental neurology* **1998**, 150, (1), 40-4.
59. Gaspar, T.; Domoki, F.; Lenti, L.; Institoris, A.; Snipes, J. A.; Bari, F.; Busija, D. W., Neuroprotective effect of adenoviral catalase gene transfer in cortical neuronal cultures. *Brain research* **2009**, 1270, 1-9.
60. Jung, J. E.; Kim, G. S.; Narasimhan, P.; Song, Y. S.; Chan, P. H., Regulation of Mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by STAT3 in mice after cerebral ischemia. *J Neurosci* **2009**, 29, (21), 7003-14.
61. Chakravorty, S. J.; Hughes, K. R.; Craig, A. G., Host response to cytoadherence in *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Society transactions* **2008**, 36, (Pt 2), 221-8.
62. Srivastava, S.; Chandrasekar, B.; Gu, Y.; Luo, J.; Hamid, T.; Hill, B. G.; Prabhu, S. D., Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to beta-adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. *Cardiovasc Res* **2007**, 74, (3), 445-55.
63. Desruisseaux, M. S.; Iacobas, D. A.; Iacobas, S.; Mukherjee, S.; Weiss, L. M.; Tanowitz, H. B.; Spray, D. C., Alterations in the brain transcriptome in *Plasmodium berghei* ANKA infected mice. *Journal of Neuroparasitology* **2010**, 1, 1-8.
64. Liu, Y.; Adachi, M.; Zhao, S.; Hareyama, M.; Koong, A. C.; Luo, D.; Rando, T. A.; Imai, K.; Shinomura, Y., Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death Differ* **2009**, 16, (6), 847-57.
65. Zhou, W.; Bercury, K.; Cumiskey, J.; Luong, N.; Lebin, J.; Freed, C. R., Phenylbutyrate upregulates DJ-1 and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson's disease. *The Journal of biological chemistry* **2011**.
66. Kops, G. J.; Dansen, T. B.; Polderman, P. E.; Saarloos, I.; Wirtz, K. W.; Coffey, P. J.; Huang, T. T.; Bos, J. L.; Medema, R. H.; Burgering, B. M., Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **2002**, 419, (6904), 316-21.
67. Glimcher, L. H., XBP1: the last two decades. *Ann Rheum Dis* **2010**, 69 Suppl 1, i67-71.
68. Thomas, B.; Beal, M. F., Parkinson's disease. *Human molecular genetics* **2007**, 16 Spec No. 2, R183-94.
69. Batelli, S.; Albani, D.; Rametta, R.; Polito, L.; Prato, F.; Pesaresi, M.; Negro, A.; Forloni, G., DJ-1 modulates alpha-synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson's disease and involvement of HSP70. *PLoS ONE* **2008**, 3, (4), e1884.
70. Xu, X. M.; Lin, H.; Maple, J.; Bjorkblom, B.; Alves, G.; Larsen, J. P.; Moller, S. G., The Arabidopsis DJ-1a protein confers stress protection through cytosolic SOD activation. *J Cell Sci* **2010**, 123, (Pt 10), 1644-51.

71. Das, B. S.; Mohanty, S.; Mishra, S. K.; Patnaik, J. K.; Satpathy, S. K.; Mohanty, D.; Bose, T. K., Increased cerebrospinal fluid protein and lipid peroxidation products in patients with cerebral malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1991**, 85, (6), 733-4.
72. Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E., Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology* **1994**, 233, 346-57.
73. Cecarini, V.; Gee, J.; Fioretti, E.; Amici, M.; Angeletti, M.; Eleuteri, A. M.; Keller, J. N., Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **2007**, 1773, (2), 93-104.
74. Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, W.; Fisher, S. K.; Uhler, M. D., *Basic Neurochemistry*. Lippincott-Raven: Philadelphia, **1999**.
75. Lacerda-Queiroz, N.; Rodrigues, D. H.; Vilela, M. C.; Miranda, A. S.; Amaral, D. C.; Camargos, E. R.; Carvalho, L. J.; Howe, C. L.; Teixeira, M. M.; Teixeira, A. L., Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in Plasmodium berghei (strain ANKA)-infected mice. *Experimental parasitology* **2010**.
76. Penet, M. F.; Viola, A.; Confort-Gouny, S.; Le Fur, Y.; Duhamel, G.; Kober, F.; Ibarrola, D.; Izquierdo, M.; Coltel, N.; Gharib, B.; Grau, G. E.; Cozzone, P. J., Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci* **2005**, 25, (32), 7352-8.
77. Boivin, M. J.; Bangirana, P.; Byarugaba, J.; Opoka, R. O.; Idro, R.; Jurek, A. M.; John, C. C., Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics* **2007**, 119, (2), e360-6.
78. Schluesener, H. J.; Kremsner, P. G.; Meyermann, R., Heme oxygenase-1 in lesions of human cerebral malaria. *Acta Neuropathol* **2001**, 101, (1), 65-8.
79. Ferreira, A.; Marguti, I.; Bechmann, I.; Jeney, V.; Chora, A.; Palha, N. R.; Rebelo, S.; Henri, A.; Beuzard, Y.; Soares, M. P., Sick hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell* **2011**, 145, (3), 398-409.
80. Oakley, M. S.; McCutchan, T. F.; Anantharaman, V.; Ward, J. M.; Faucette, L.; Erexson, C.; Mahajan, B.; Zheng, H.; Majam, V.; Aravind, L.; Kumar, S., Host biomarkers and biological pathways that are associated with the expression of experimental cerebral malaria in mice. *Infection and immunity* **2008**, 76, (10), 4518-29.
81. Waknine-Grinberg, J. H.; McQuillan, J. A.; Hunt, N.; Ginsburg, H.; Golenser, J., Modulation of cerebral malaria by fasudil and other immune-modifying compounds. *Experimental parasitology* **2010**, 125, (2), 141-6.

5. DISCUSIÓN GENERAL

5.1.- CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO NEUROLÓGICO PROGRESIVO DE LA MALARIA CEREBRAL MURINA

La malaria cerebral es una de las complicaciones más graves de la infección por *P. falciparum* en humanos que se caracteriza por una pérdida aguda de la funcionalidad cerebral del hospedador. Los resultados procedentes de estudios clínicos, junto con los obtenidos a partir de autopsias y de la investigación en modelos experimentales, han revelado la existencia de múltiples factores patogénicos capaces de desencadenar esta grave encefalopatía. Sin embargo, aún se desconoce la secuencia de eventos moleculares que originan las alteraciones neurológicas asociadas a la malaria cerebral.

Por razones obvias, el análisis del progreso de la patología cerebral en humanos no es posible. Por ello, los modelos animales constituyen una herramienta imprescindible y extraordinariamente útil para el estudio del desarrollo de la malaria cerebral. De hecho, gran parte de los hallazgos que se han visto tanto en pacientes como en muestras post-mortem, han sido observados originalmente en este tipo de modelos (Combes *et al.*, 2005).

Los modelos experimentales de malaria cerebral más utilizados son los murinos, ya que, aunque los modelos en primates muestran cambios patológicos similares a los de los humanos, también presentan inconvenientes como son la imprevisibilidad de la incidencia de esta complicación cerebral, la determinación del momento en el que comienza, los protocolos éticos y la falta de animales genéticamente modificados (Brian de Souza *et al.*, 2009; Combes *et al.*, 2005; de Souza & Riley, 2002; Lou *et al.*, 2001).

Así, para el estudio de la fisiopatología de la malaria cerebral, los modelos murinos son los de elección, debido a las numerosas similitudes que presentan con la enfermedad humana (Hunt & Grau, 2003). Entre todos los modelos murinos de malaria cerebral, la infección de ratones de la estirpe C57BL/6 con *Plasmodium berghei* ANKA ha sido nuestro modelo de elección para llevar a cabo los estudios del presente trabajo ya que reúne la mayoría de los síntomas con los que cursa la malaria cerebral en el hombre (Brian de Souza *et al.*, 2009; Combes *et al.*, 2005; Hunt

et al., 2006; Lou *et al.*, 2001; Medana & Turner, 2006; Pierrot *et al.*, 2003; White *et al.*, 2010). Al igual que sucede en humanos, en este modelo la gravedad y mortalidad en los individuos infectados se incrementa de manera inversa con la edad, siendo más letal en los animales de 4 a 5 semanas de edad (Pierrot *et al.*, 2003).

Hasta la fecha no existe un consenso sobre la secuencia de eventos que se suceden durante la malaria cerebral (Brian de Souza *et al.*, 2009; Combes *et al.*, 2010), por lo que resulta de crucial importancia establecer un protocolo experimental que permita estudiar el desarrollo de esta patología. Para este propósito, la mayoría de investigadores definen la severidad de la enfermedad y sus manifestaciones en términos de días post-infección (Delahaye *et al.*, 2007; Jennings *et al.*, 1997; Lovegrove *et al.*, 2006). Sin embargo, en vista de la heterogeneidad que presentan los animales en el desarrollo de los primeros síntomas y el consecuente progreso de la misma (Bagot *et al.*, 2002; Brian de Souza *et al.*, 2009; Cabrales *et al.*, 2010; Carroll *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2006; Vigario *et al.*, 2007), parece más indicado clasificar a los animales de acuerdo con las manifestaciones neurológicas que van adquiriendo. Algunos autores han comenzado ya a establecer la clasificación de los individuos en dos grupos según si éstos desarrollaban sintomatología “leve” o “grave” (Penet *et al.*, 2005), a la par que otros estudios sugieren la importancia de clasificar los síntomas de la malaria cerebral asignando puntuaciones que se establecen según diferentes tests que evalúan el comportamiento de los ratones (Amante *et al.*, 2007; Carroll *et al.*, 2010; Lacerda-Queiroz *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010).

Por todo ello, un primer objetivo de este estudio fue el diseño de un nuevo protocolo de ensayo que permitiera clasificar los animales durante el desarrollo de la malaria cerebral murina atendiendo a su fenotipo neurológico mediante la evaluación de distintas funciones neurocognitivas y motoras. Con este fin, se justifica el uso del modelo de infección de ratones C57BL/6 con *P. berghei* ANKA porque, además de sus similitudes con la patología humana, la sintomatología clínica se adquiere de una forma más progresiva que en otros modelos de malaria cerebral, como es el caso de la infección con esta misma especie de *Plasmodium* en ratones CBA (Oakley *et al.*, 2010).

En nuestra clasificación de progreso de la enfermedad en cuatro estadios observamos que los animales infectados desarrollaban malaria cerebral a la par que mostraban diversas alteraciones características como lateralización, parálisis, motilidad alterada, debilidad, temblor, giros sobre sí mismos, elevación pélvica, falta de respuesta tras la estimulación, anemia, y erizamiento del pelo, síntomas que también han sido descritos en otros estudios de esta misma patología (Amante *et al.*, 2007; Carroll *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2006; Lou *et al.*, 2001; Marin-Garcia *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestro trabajo, no todos los animales mostraron todos esos signos clínicos, tan sólo la lateralización, la parálisis de las extremidades y la debilidad se observaron en el 100% de los mismos y, por tanto, fueron éstos los que se utilizaron para definir los distintos grupos de ensayo. En este contexto, cabe destacar que las alteraciones de la coordinación, la función motora y la fuerza se han visto asociadas de manera específica a la malaria cerebral. Además, al igual que sucede en nuestra clasificación, se ha puesto de manifiesto que la debilidad predomina en los animales que tienen alteraciones más severas (Lackner *et al.*, 2006). Todos estos síntomas se manifiestan también en la patología asociada a la raza humana. En este caso, cuando la enfermedad se desarrolla en niños, también se ven afectadas las funciones motoras y las posturales (Idro *et al.*, 2005).

La lateralización incipiente y/o la parálisis parcial de alguna de las extremidades fueron los primeros síntomas neurológicos que se manifestaron en los animales infectados y que se definieron como patognomónicas del estadio II. Al igual que en trabajos anteriores estos primeros signos se observaron en nuestros animales a partir del día 6 post-infección (Bagot *et al.*, 2002; Carroll *et al.*, 2010; Lacerda-Queiroz *et al.*, 2010; Lou *et al.*, 2001), aunque en nuestro ensayo no todos los individuos presentaron los síntomas iniciales al mismo tiempo. Paralelamente al establecimiento de este tiempo de infección se definió el estadio I (estadio asintomático) como la ausencia de síntomas neurológicos en animales infectados hasta el momento en que éstos comienzan a aparecer en los otros ratones (aproximadamente hasta el día 6 del mismo ensayo). A partir del estadio II, los síntomas iniciales se agravaron progresivamente y dan lugar a los estadios III y IV, acompañándose de un incremento en la debilidad y una motilidad cada vez más reducida. Los síntomas más graves se manifestaron transcurridas entre 6 y 30 horas después de que apareciesen los primeros síntomas neurológicos (Figura 14). La

rápida complicación de los síntomas neurológicos observada en nuestro trabajo coincide con la descrita previamente por otros autores (Brian de Souza *et al.*, 2009; Carroll *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2006), aunque en éstos los animales no sean clasificados en estadios.

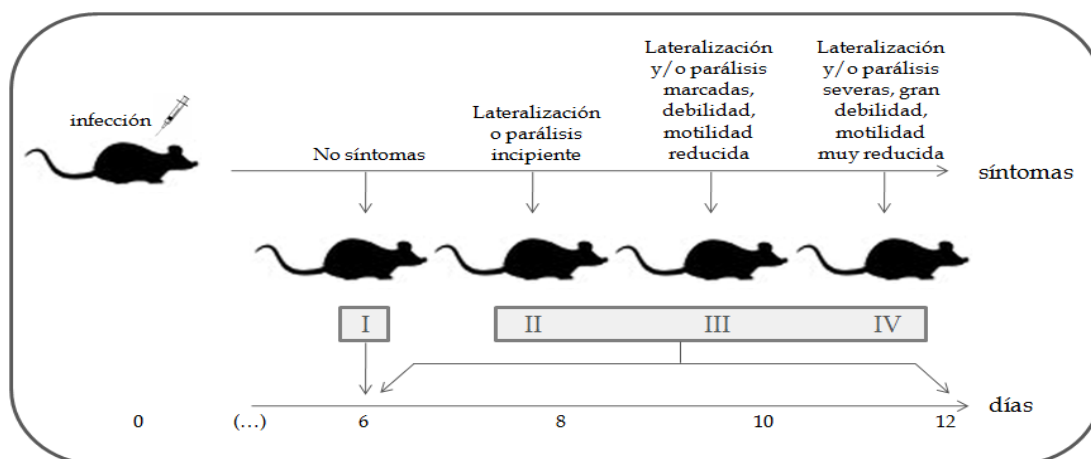


Figura 14.- Caracterización del fenotipo neurológico asociado al progreso de la malaria cerebral en un modelo murino. Los animales infectados se clasificaron en cuatro estadios (I-IV) según los síntomas neurológicos que desarrollaban (eje horizontal superior). Tanto la adquisición como el progreso de las manifestaciones clínicas mostraron gran variabilidad temporal entre los distintos animales ensayados (eje horizontal inferior).

Estos resultados sostienen que la sintomatología clínica que aparece durante el curso de la enfermedad se desarrolla de forma heterogénea entre los ratones infectados (Amante *et al.*, 2007; Bagot *et al.*, 2002; Brian de Souza *et al.*, 2009; Cabrales *et al.*, 2010; Carroll *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2006; Vigario *et al.*, 2007). Dicha heterogeneidad clínica de la malaria también ha sido observada en humanos (Brian de Souza *et al.*, 2009; Medana & Turner, 2006; Schofield & Grau, 2005; van der Heyde *et al.*, 2006). Es por tanto que esta nueva clasificación en estadios agrupados en función de la gravedad del cuadro neurológico de los individuos infectados resulta esencial para llevar a cabo estudios que ayuden a elucidar los procesos patológicos y clínicos claves de la enfermedad humana reduciendo al mínimo la variabilidad producida por la heterogeneidad en el desarrollo de la malaria cerebral experimental murina.

Por otro lado, nuestra organización del modelo en estadios según el comportamiento puede resultar muy útil para la evaluación de terapias preventivas del desarrollo de las complicaciones neurológicas en enfermos de malaria. La

administración rápida de antimaláricos es, hoy en día, el único tratamiento efectivo para que esta enfermedad no progrese hacia la forma cerebral (Oakley *et al.*, 2010) y, sin embargo, un 15-20% de los pacientes desarrollan esta complicación (Newton & Krishna, 1998; Taylor, 2009). Además, debido a la dificultad de su diagnóstico, éste es incorrecto en un 25% de los casos que la sufren (Taylor *et al.*, 2004). Por todo ello, es necesario establecer de forma temprana terapias más específicas para su tratamiento y nuevos métodos para el pronóstico. Así, este protocolo basado en la caracterización fenotípica de la malaria cerebral puede resultar útil en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y marcadores específicos de esta complicación en fases tempranas de la enfermedad, lo que presumiblemente podría contribuir a que el efecto de los tratamientos que se desarrollan en la actualidad sean más efectivos.

5.2.- FACTORES NEUROPROTECTORES EN LA MALARIA CEREBRAL

Estudios recientes llevados a cabo en modelos animales de malaria cerebral han puesto de manifiesto la existencia de alteraciones en las vías de neuroprotección (Delahaye *et al.*, 2007). Así, se ha visto que en el transcurso de esta patología se producen alteraciones neurocognitivas de diversa gravedad que pueden ser de carácter temporal o permanente como se deduce de las secuelas neurológicas que presentan algunos de los pacientes que se recuperan de la misma, especialmente en niños menores de 5 años (Boivin *et al.*, 2007; Idro *et al.*, 2010a; Idro *et al.*, 2010b).

La plasticidad sináptica, fenómeno mediante el cual las conexiones en las sinapsis se modifican en respuesta a la actividad y experiencia (Bingol & Sheng, 2011; Lu, 2003), parece estar jugando un papel crítico en la malaria cerebral, ya que los procesos cognitivos dependen del correcto establecimiento de estas conexiones. Por otro lado, el daño neuronal parece también ser un suceso clave de la misma (Medana & Turner, 2007; Rao *et al.*, 2010), que podría estar acompañado por el daño en otras poblaciones celulares del sistema nervioso central (Bentivoglio *et al.*, 2010; Medana *et al.*, 2007; Medana *et al.*, 2001; Miu *et al.*, 2008; Penet *et al.*, 2005). Por todo ello, un segundo objetivo de este estudio fue evaluar el papel que juegan distintos factores neuroprotectores en el desarrollo de esta patología.

El BDNF es una importante neurotrofina que se expresa de forma abundante en cerebelo, hipocampo y cortex y modula la integridad del sistema nervioso central, incluyendo los procesos de plasticidad sináptica y supervivencia neuronal. Este factor neurotrófico, capaz de actuar sobre distintos tipos celulares (Ebadi *et al.*, 1997; Enstrom *et al.*, 2008), está implicado en la regeneración de axones, el crecimiento y la diferenciación neuronal (Cunha *et al.*, 2010; Gordon, 2009; Lu, 2003) y la supervivencia de otras células (Madri, 2009; Ruprecht *et al.*, 2002). En diversas situaciones patológicas que comprometen al sistema nervioso central, se ha observado que variaciones en el nivel o en la distribución del BDNF pueden ocasionar alteraciones fisiológicas de la función cerebral (Zuccato & Cattaneo, 2009).

Por ello, y debido a la creciente importancia clínica que está adquiriendo este factor neurotrófico (Fumagalli *et al.*, 2006a), nos propusimos evaluar su posible implicación en el desarrollo de la malaria cerebral. Los análisis de PCR cuantitativa a tiempo real llevados a cabo en ratones infectados con *P. berghei* ANKA mostraron una expresión disminuida de los niveles de ARN mensajero de *bdnf* a lo largo del progreso de la enfermedad en las distintas regiones cerebrales ensayadas, siendo especialmente notable la disminución del mismo en el tallo y en el cerebelo.

Las alteraciones observadas en los niveles de expresión de esta neurotrofina podrían ser responsables de los daños ocasionados en las poblaciones celulares cerebrales durante la malaria cerebral. Sin embargo, no se puede descartar un proceso inverso, donde el daño neuronal producido durante esta complicación esté mediando la disminución en sus niveles de expresión, ya que la transcripción de *bdnf* depende de la actividad neuronal (Lu, 2003).

Debido a que el BDNF también juega un importante papel en la organización del endotelio (Donovan *et al.*, 2000), la disminución de sus niveles de expresión podría ser responsable de las alteraciones que se producen en la barrera hematoencefálica durante el desarrollo de la malaria cerebral (Medana & Turner, 2006), lo que podría contribuir a acelerar el daño en otras poblaciones celulares del sistema nervioso (Hunt *et al.*, 2006; Medana *et al.*, 2001) y determinar así las alteraciones observadas en los procesos posteriores relacionados con la atención que aparecen como secuelas de la enfermedad en humanos (John *et al.*, 2008).

Alteraciones en los niveles de expresión de *bdnf* también pueden ser responsables de los cambios en la neurotransmisión descritos durante la malaria cerebral (Combes *et al.*, 2005; Marin-Garcia *et al.*, 2009) dada la capacidad de estas neurotrofinas de modular la eficacia de la transmisión sináptica (Lu, 2003).

El BDNF es crítico para la supervivencia neuronal tras el daño cerebral (Ebadi *et al.*, 1997), lo que sugiere que la alteración en sus niveles de expresión observada en nuestro estudio podría determinar un punto crítico de no retorno para el deterioro neurocognitivo observado en los pacientes que se recuperan. La reducción de los niveles de expresión de *bdnf* también ha sido descrita en la patogénesis de otros desórdenes neurológicos que afectan al aprendizaje y la memoria, como en el Alzheimer y a la capacidad motora como en el Parkinson o en la enfermedad de Huntington (Zuccato & Cattaneo, 2009). Esta neurotrofina facilita el proceso de plasticidad sináptica, de forma que niveles de BDNF inferiores a los requerimientos fisiológicos pueden alterar estos procesos mencionados (Cunha *et al.*, 2010). Así, la interferencia de la función del BDNF puede producir daños cognitivos, déficits en el aprendizaje y alteraciones en la memoria (Cunha *et al.*, 2010; Zuccato & Cattaneo, 2009), que se podrían relacionar con los trastornos en lenguaje y memoria observados en niños que se recuperan de la malaria cerebral (Amante *et al.*, 2007; Boivin *et al.*, 2007; Idro *et al.*, 2005).

Por todo ello, el BDNF podría estar jugando un papel crucial en la patogénesis de la malaria cerebral y/o en sus secuelas. En este sentido, cabe destacar que los ratones C57BL/6, susceptibles a desarrollar la enfermedad, presentan niveles basales de BDNF más bajos que otras cepas de ratones y se ha visto que no son capaces de restaurar los niveles originales tras una situación de estrés, al contrario de lo que sucede con otras cepas resistentes como es el caso de BALB/c (Lewitus *et al.*, 2008; Madri, 2009).

En el presente trabajo, los análisis de expresión de *bdnf* se determinaron en aquellas regiones cerebrales que parecen alteradas durante la malaria cerebral. En nuestro modelo, las mayores disminuciones en los niveles de expresión de esta neurotrofina se encontraron en tálamo-hipotálamo, cerebelo, tallo y cortex. Estudios previos, también llevados a cabo en modelos de malaria cerebral murina, han

puesto de manifiesto que existe un daño neuronal en estas mismas regiones (Lovegrove *et al.*, 2006; Penet *et al.*, 2005), lo que, teniendo en cuenta nuestros resultados, podría relacionarse con la disminución en los niveles de expresión de *bdnf* observada.

El BDNF es particularmente abundante en el cerebelo, región central para el desarrollo de las funciones cognitivas (Cunha *et al.*, 2010; Lessmann & Brigadski, 2009). Allí, se expresa abundantemente en los axones terminales de las células granulares que contactan con las células de Purkinje (Lessmann & Brigadski, 2009). Sin embargo, en este trabajo, el uso de técnicas inmunohistoquímicas puso de manifiesto que, en el estadio más avanzado de la enfermedad, el BDNF queda retenido en los cuerpos neuronales, reduciéndose su presencia en la red de fibras axodendríticas del cerebelo de los ratones infectados. Esto podría explicarse por una disfunción en el sistema de transporte axonal, mecanismo que se ha visto alterado durante el desarrollo de la malaria cerebral humana (Medana & Esiri, 2003). Así mismo, una variación en el sistema de recambio proteico vía proteasoma, podría contribuir a la distribución anormal que presenta el BDNF y explicaría que la disminución transcripcional del *bdnf* no se vea correspondida con cambios a nivel de proteína. La Figura 15 esquematiza estas hipótesis y recoge los posibles mecanismos de acción mediante los cuales la disminución en la expresión transcripcional del *bdnf* puede contribuir al desarrollo de la malaria cerebral.

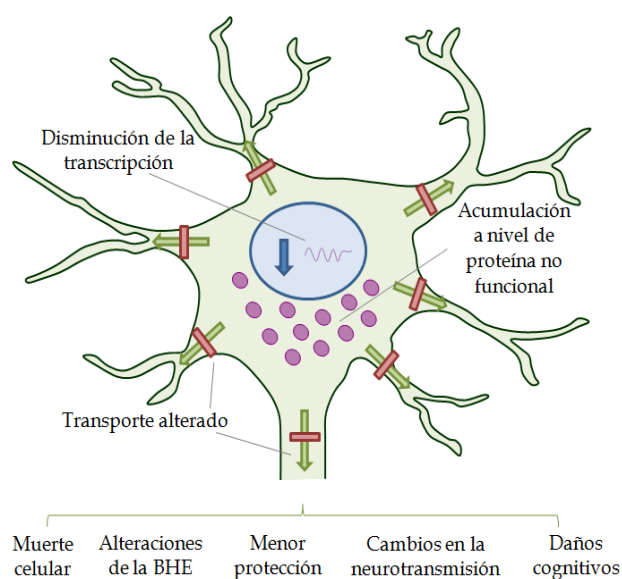


Figura 15.- Esquema explicativo de los resultados obtenidos en cuanto a expresión y distribución del BDNF. Nuestros resultados señalan que durante la malaria cerebral se produce una disminución del proceso de transcripción del *bdnf*. La acumulación de proteínas no funcionales podría estar enmascarando su disminución a nivel proteico. Un transporte alterado impediría al BDNF llegar hasta las fibras axodendríticas. La alteración en los niveles de transcripción y distribución del BDNF provocaría disfunciones en los procesos en los que dicho factor está implicado. BHE: barrera hematoencefálica.

El proteasoma, como sistema que regula la degradación de proteínas, juega un papel primordial en todos los procesos fisiológicos y en especial en aquellos que requieran un mayor recambio proteico, siendo su misión crítica en la supervivencia neuronal y en la plasticidad sináptica, debido a que puede interaccionar con el BDNF (Dong *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2008). En el sistema nervioso central se ha visto, por un lado, que el BDNF tiene un efecto sobre la expresión del sistema proteasoma (Santos *et al.*, 2010) y, por otro lado, que el sistema del proteasoma bloquea la transcripción de *bdnf* en el sistema nervioso central (Dong *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y dada la alteración a nivel cerebral del BDNF que observamos durante el desarrollo de la malaria cerebral murina, procedimos al estudio de la expresión de dos de las subunidades constitutivas del proteasoma, $\beta 1$ Y $\beta 5$, a fin de conocer si este sistema también sufre alguna variación asociada al transcurso de la enfermedad. Los resultados obtenidos mostraron una paulatina disminución en ambas subunidades a lo largo del progreso de la misma, siendo cerebelo y tallo donde aparecieron los valores más bajos observados.

Recientemente se ha visto que en la malaria cerebral murina se produce la disminución de otra molécula clave implicada en el sistema ubiquitina-proteasoma, el complejo ubiquitina ligasa, que media la poliubiquitinación de proteínas mal plegadas (Desruisseaux *et al.*, 2010), lo que apoya nuestros resultados de un efecto patogénico en el sistema proteasoma del cerebro, que impide un recambio proteico adecuado.

Esta disfunción transcripcional del sistema del proteasoma podría producir una acumulación de proteínas mal plegadas y enmascarar la disminución de los niveles de proteína funcional que se observa en nuestro trabajo, ya que los complejos del ligando BDNF con su receptor pueden ser internalizados para su degradación vía sistema ubiquitina-proteasoma (Sommerfeld *et al.*, 2000). Además, una alteración en este sistema de degradación proteica también podría contribuir en la disminución de los niveles de esta neurotrofina a nivel de mensajero (Dong *et al.*, 2008). La inhibición de ambos se ha considerado potencialmente sinérgico en la disfunción neuronal de alteraciones neurológicas como la enfermedad de Huntington (Seo *et al.*, 2008)

La alteración del recambio proteico interfiere con la función sináptica y los mecanismos de aprendizaje y memoria (Bingol & Sheng, 2011; Nguyen *et al.*, 2010). El impedimento de un recambio normal de proteínas en localizaciones como las sinapsis puede ser especialmente devastador debido a que las moléculas proteicas implicadas en la formación de la memoria se recambian a gran velocidad (Nguyen *et al.*, 2010).

Además, se ha visto que, tanto la expresión reducida del proteasoma como su inhibición, conducen a la muerte neuronal (Konstantinova *et al.*, 2008; Kwak *et al.*, 2003). Esto podría deberse a la inhibición de la degradación o el procesamiento de reguladores específicos (Konstantinova *et al.*, 2008) o a la propia acumulación de proteínas disfuncionales, que induciría apoptosis (Kwak *et al.*, 2003).

La actividad del proteasoma se ha visto afectada por distintos factores ambientales como el estrés oxidativo, diversos estados patológicos y enfermedades neurológicas (Konstantinova *et al.*, 2008). Así, niveles alterados del sistema proteasoma han sido ya descritos en distintas enfermedades del sistema nervioso central, como son el Alzheimer, Parkinson y Huntington (Bingol & Sheng, 2011; Dong *et al.*, 2008; Ferrer *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2010; Zuccato & Cattaneo, 2009). La agregación y deposición de proteínas mal plegadas es un distintivo de las enfermedades neurodegenerativas y puede reflejar el fallo del mecanismo de recambio proteico, que además tampoco sería capaz de eliminar proteínas que hayan sufrido alguna modificación, como por ejemplo la oxidación (Bingol & Sheng, 2011; Nguyen *et al.*, 2010).

Todavía se desconoce si la disminución del proteasoma es una causa o una consecuencia tardía de la enfermedad ya que en muchos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas no se observan cambios en etapas tempranas (Rubinsztein, 2006). Sin embargo, en nuestro modelo de malaria cerebral murina se observó una disminución progresiva desde el primer estadio asintomático de esta patología, por lo que el proteasoma podría contribuir al desarrollo de alteraciones más tardías.

Por otro lado, se ha propuesto que las subunidades del proteasoma se pueden degradar mediante la acción de caspasas, las cuales también se han visto inducidas en la malaria cerebral (Medana *et al.*, 2001; Wiese *et al.*, 2006), lo que favorecería una mayor disminución en el sistema proteasoma durante esta enfermedad.

Una de las hipótesis más aceptadas en la patogénesis de la malaria cerebral apoya que uno de los principales factores implicados en ella es la respuesta inmune exacerbada que se produce en el hospedador y que es responsable de la inflamación observada. Se ha descrito que este fenómeno inflamatorio puede incrementar la expresión de las subunidades del inmunoproteasoma induciendo el cambio del proteasoma constitutivo hacia el complejo del inmunoproteasoma, especializado en el procesamiento de polipéptidos para la presentación de antígenos (Nguyen *et al.*, 2010). Estudios *in vitro* han demostrado que esta inducción se regula a nivel transcripcional (Gavilan *et al.*, 2009).

Por ello, y con el fin de investigar si en nuestro modelo existe este intercambio de subunidades proteasoma/ inmunoproteasoma, se analizó la expresión de dos de las subunidades inducibles, *lmp2* y *lmp7*, del inmunoproteasoma. Los resultados obtenidos demostraron que ambas subunidades se indujeron muy tempranamente, desde el estadio I (asintomático) de la enfermedad, alcanzando de nuevo valores máximos de expresión en el cerebelo.

Estos resultados indican que en las células del cerebro, durante la malaria cerebral, se está produciendo un cambio del proteasoma constitutivo a favor del inmunoproteasoma, lo que dificultará aún más la función del proteasoma en el correcto recambio de proteínas. Una inducción del inmunoproteasoma acompañada de una expresión anormal del proteasoma constitutivo y la consecuente acumulación de proteínas mal plegadas y agregados proteicos se ha observado en otras enfermedades neurológicas (Ferrer *et al.*, 2004; Gavilan *et al.*, 2009). Curiosamente, el potenciamiento de la memoria induce las subunidades constitutivas y disminuye las inducibles (Gavilan *et al.*, 2009), lo que nos sugiere que la inducción del inmunoproteasoma observada en nuestro modelo experimental contribuye al daño cognitivo, probablemente mediante la agregación de proteínas.

Por último, las subunidades del inmunoproteasoma parecen estar implicadas en la proliferación de las células T CD8+ (Groettrup *et al.*, 2010). El secuestro de estas células en el cerebro parece ser un factor crucial en el desarrollo de la malaria cerebral y también se ha sugerido que estas células podrían estar implicadas en la inducción de la expresión de moléculas de adhesión, favoreciendo la acumulación de glóbulos rojos infectados (Baptista *et al.*, 2010). De esta manera, la inducción del inmunoproteasoma también podría contribuir a la patología de la malaria cerebral potenciando el secuestro de este tipo de células.

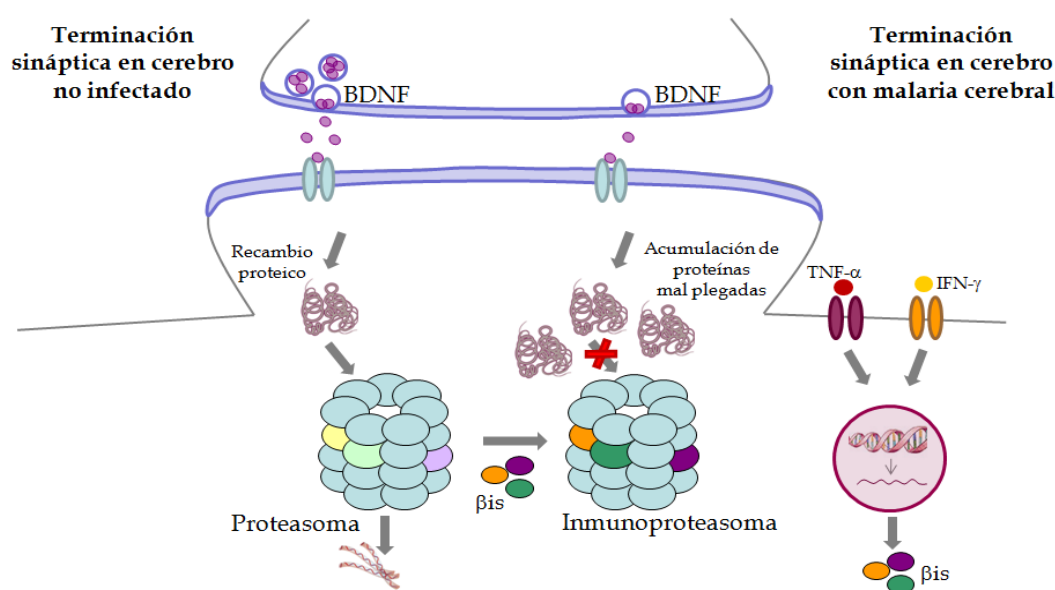


Figura 16.- Disfunción del proteasoma durante el progreso de la malaria cerebral y su posible implicación en las alteraciones cognitivas asociadas. La disminución de la expresión del proteasoma y su intercambio a favor del inmunoproteasoma, inducido por las citoquinas TNF- α e IFN- γ , produce una alteración en el recambio proteico que interfiere con la función sináptica normal y los mecanismos de aprendizaje y memoria. Entre los procesos afectados se encontraría la síntesis y degradación del BDNF. β is: subunidades catalíticas responsables del cambio del proteasoma hacia inmunoproteasoma.

TNF- α e IFN- γ son dos citoquinas que inducen la expresión del inmunoproteasoma (Groettrup *et al.*, 2010), las cuales, junto con la LT- α , se ha postulado que participan en la patogénesis de la malaria cerebral (Chen *et al.*, 2000; Engwerda *et al.*, 2002; Hunt & Grau, 2003; Lou *et al.*, 2001; Weiser *et al.*, 2007). Con el fin de estudiar si dichas citoquinas están relacionadas temporalmente en la inducción del inmunoproteasoma observada en nuestro modelo experimental murino, analizamos su expresión en los animales que se encontraban en el estadio I, todavía asintomático de la enfermedad.

Los resultados obtenidos mostraron que mientras los niveles de expresión de *tnf- α* e *ifn- γ* ya estaban incrementados en esta fase temprana de la patología, los niveles de expresión de *lt- α* se mantenían inalterados en este estadio. Este resultado sugiere que la inducción temprana de *tnf- α* e *ifn- γ* como respuesta inflamatoria podría ser desencadenante del intercambio de las subunidades del proteasoma durante la malaria cerebral. En este sentido, se ha postulado que la regulación de la función del proteasoma mediante la incorporación de las subunidades inducibles es debida al microambiente local de citoquinas (Kloetzel, 2004). La Figura 16 resume las alteraciones que sufre el proteasoma durante el desarrollo de la malaria cerebral y su posible relación con los trastornos observados en los niveles de BDNF.

De esta manera, la neuroinflamación emerge como un factor clave en el desarrollo de las alteraciones cognitivas (Gavilan *et al.*, 2009). Se ha observado que el sistema inmune influyen también en la inducción del fenómeno de plasticidad sináptica y que las citoquinas pro-inflamatorias tienen un efecto deletéreo en las funciones neuronales, la viabilidad y la plasticidad sináptica (Di Filippo *et al.*, 2008; Lisak *et al.*, 2007). Además, se ha observado que las citoquinas secretadas por la microglía en el sistema nervioso, aun pudiendo ser neuroprotectoras inicialmente, pueden posteriormente llegar a ser citotóxicas (Sawada *et al.*, 2006).

En este sentido, las citoquinas de la vía TH-2, predominantes en modelos resistentes frente al desarrollo de la malaria cerebral inducen la expresión de *bdnf*, mientras que citoquinas de la vía TH-1, predominantes en los modelos susceptibles de malaria cerebral disminuyen su expresión (Lisak *et al.*, 2007). Por otro lado, la disminución de la expresión de esta neurotrofina observada en nuestro modelo experimental dificultará la protección del cerebro frente al daño producido por la inflamación (Enstrom *et al.*, 2008) durante el desarrollo de esta patología.

TNF- α e IFN- γ tienen efectos inhibitorios en la protección del cerebro y la plasticidad sináptica (Di Filippo *et al.*, 2008; Lisak *et al.*, 2007; Pino *et al.*, 2005). De hecho, el incremento de la expresión de *tnf- α* se ha relacionado con niveles disminuidos de expresión de *bdnf* en el sistema nervioso central (Sawada *et al.*, 2006) y con daños neurológicos y cognitivos (Di Filippo *et al.*, 2008; Mishra & Newton, 2009). En niños con malaria cerebral, se observan niveles elevados de TNF- α en el

líquido cefalorraquídeo, que además se han relacionado con daños en la memoria y atención, sugiriendo que el TNF- α afecta negativamente al pronóstico cognitivo a largo plazo (Idro *et al.*, 2010b). Además, el TNF- α también puede producir la muerte de células endoteliales con la consecuente producción de hemorragias (Jennings *et al.*, 1997), lo que también se ha asociado con el daño cognitivo (Brian de Souza *et al.*, 2009). En este sentido, cabe destacar que es la localización tisular de las hemorragias, más que el número de ellas, lo que condiciona la gravedad del daño en el cerebro (Carroll *et al.*, 2010).

Por otro lado, estas dos citoquinas parecen estar implicadas también en la inducción de distintas moléculas que median procesos de adhesión entre los glóbulos rojos infectados y el endotelio vascular (Armah *et al.*, 2005; de Souza & Riley, 2002; Jennings *et al.*, 1997; Lou *et al.*, 2001; Pino *et al.*, 2005; Schofield & Grau, 2005; Turner *et al.*, 1994; van der Heyde *et al.*, 2006; Weiser *et al.*, 2007), aunque aún no existe un consenso en cuanto a la secuencia de estos eventos responsables de la citoadherencia que se produce en el transcurso de la patología (Brian de Souza *et al.*, 2009; Combes *et al.*, 2010). En este contexto, NCAM, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que juega un papel importante en el desarrollo normal del cerebro (Aisa *et al.*, 2010), podría estar también implicada en este fenómeno de citoadherencia, ya que se ha descrito su capacidad *in vitro* de adherir eritrocitos infectados (Pouvelle *et al.*, 2007).

Así, con el fin de comprobar su posible papel en la adhesión de los hematíes infectados en la microvasculatura cerebral, se procedió en el presente trabajo a estudiar la acumulación de glóbulos rojos en el cerebro en paralelo con los niveles de expresión de *ncam* y de otras moléculas de expresión que previamente se han visto inducidas en el cerebro durante la patología de la malaria cerebral, como son ICAM-1, VCAM-I, P-selectina y E-selectina (Armah *et al.*, 2005; Brian de Souza *et al.*, 2009; Turner *et al.*, 1994).

En primer lugar, nuestros resultados revelaron una relación temporal entre la aparición de los síntomas neurológicos y la acumulación de parásitos en el tejido cerebral -pero no en sangre ni en órganos periféricos-, sugiriendo que el secuestro de eritrocitos infectados ocurre selectivamente en el cerebro de ratones con malaria

cerebral. Aunque este fenómeno ha sido también observado por otros autores (Amante *et al.*, 2007; Baptista *et al.*, 2010; Brian de Souza *et al.*, 2009; Engwerda *et al.*, 2002; Hearn *et al.*, 2000; Jennings *et al.*, 1997; Lackner *et al.*, 2006), contrasta con otros resultados donde la acumulación de glóbulos rojos infectados tan sólo se detecta en los órganos periféricos (Franke-Fayard *et al.*, 2005).

Estos datos contradictorios pueden explicarse debido a que las técnicas de imagen empleadas en este último estudio pueden subestimar la acumulación de glóbulos rojos infectados en cerebro (Baptista *et al.*, 2010; Brian de Souza *et al.*, 2009). Como muestran nuestros resultados, el número de parásitos detectado en tejidos periféricos altamente vascularizados es mucho más alto que en cerebro, aunque no se produzca su incremento progresivo de forma paralela al desarrollo de los síntomas neurológicos de la enfermedad. Este fenómeno podría enmascarar el incremento de eritrocitos infectados en el cerebro, por lo que se requiere el uso de técnicas con mayor resolución para clarificar el mecanismo del secuestro que se produce durante la malaria cerebral. De todos los tejidos analizados en nuestro estudio, la mayor acumulación de parásitos se observó en cerebelo (Jennings *et al.*, 1997; Marin-Garcia *et al.*, 2009; Sein *et al.*, 1993) y en tallo.

En segundo lugar, de los estudios realizados en este trabajo se observó que se produce una inducción temprana de los niveles de expresión de *icam-1*, *vcam-1*, *e-selectina* y *p-selectina* desde el estadio asintomático de la enfermedad. Estos resultados sugieren que es necesario que aumente la expresión de estas moléculas en los primeros estadios de la enfermedad para que se produzca la posterior acumulación de los hematíes infectados en el endotelio cerebral (Armah *et al.*, 2005; Brian de Souza *et al.*, 2009; Ho & White, 1999; Turner *et al.*, 1994). Aunque algunos autores (Clark *et al.*, 2006) han sugerido la existencia de dos etapas de inducción en la expresión de estas moléculas de adhesión, en este trabajo sólo se observa una temprana y que se mantiene durante el curso de la enfermedad.

Al analizar los resultados de expresión en las distintas regiones, los valores más altos se obtuvieron nuevamente en cerebelo y tallo, regiones donde también se produjo una mayor acumulación de parásitos. En pacientes afectados de malaria cerebral también se observa una mayor expresión de estas moléculas en secciones de

cerebelo (Armah *et al.*, 2005), lo que apoya nuestra hipótesis de que la inducción en estadios iniciales de moléculas de adhesión facilitarían la consecuente acumulación de eritrocitos infectados.

Algunos autores han sugerido que el secuestro de glóbulos rojos infectados en el cerebro puede ser el evento responsable de la inducción de citoquinas (Armah *et al.*, 2005), no obstante, nuestros resultados sugieren que es la expresión temprana de *tnf- α* e *ifn- γ* la que dispara la acumulación de los glóbulos rojos infectados mediante la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión (Armah *et al.*, 2005; de Souza & Riley, 2002; Jennings *et al.*, 1997; Lou *et al.*, 2001; Pino *et al.*, 2005; Schofield & Grau, 2005; Turner *et al.*, 1994; van der Heyde *et al.*, 2006; Weiser *et al.*, 2007).

Aunque también se ha sugerido que la LT- α media la inducción de las moléculas de adhesión durante la malaria cerebral (Hunt & Grau, 2003; Weiser *et al.*, 2007), en nuestro modelo no se observaron cambios tempranos de esta citoquina, lo que sugiere que no participa en la inducción precoz de estas moléculas. Sin embargo, debido a que en estadios terminales de malaria cerebral murina se han observado elevados niveles de LT- α (Engwerda *et al.*, 2002; Hunt *et al.*, 2006; Rae *et al.*, 2004), quizás como consecuencia de alteraciones cerebrales más tardías, no podemos descartar que esta citoquina juegue un papel relevante en la patogenia de los estadios más avanzados de la enfermedad.

En tercer lugar, nuestros resultados mostraron que los niveles de expresión de *ncam* sufrían una disminución asociada a la severidad de los síntomas neurológicos. Al igual que sucedía con las otras moléculas de adhesión, las mayores variaciones en la expresión de ARN mensajero se obtuvieron en cerebelo y tallo. Estos resultados sugieren que esta molécula de adhesión no participaría en el fenómeno de citoadherencia (Pouvellet *et al.*, 2007), sino que su disminución podría estar contribuyendo, junto con la de BDNF y el proteasoma, a los cambios neurológicos que aparecen en la malaria cerebral (Figura 17). En este sentido, niveles alterados de la NCAM se han visto asociados a diversos trastornos del sistema nervioso central (Aisa *et al.*, 2010; Fukami *et al.*, 2000).

Entre las distintas clases de moléculas de adhesión, la NCAM muestra particularidades en varios aspectos. Por un lado, contribuye a la supervivencia, migración y diferenciación celular; participa en la supervivencia neuronal y el crecimiento axonal (Bisaz *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2007); y, además, puede producir la regeneración de axones y contribuir a la recuperación tras el daño (Bisaz *et al.*, 2009; Kiss *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2007). Por otro lado, la NCAM está implicada en la formación y estabilización de las sinapsis, contribuyendo a la plasticidad sináptica y a los procesos de aprendizaje y memoria (Bisaz *et al.*, 2009; Kiss *et al.*, 2001; Vutskits *et al.*, 2001). De esta forma, cambios en los niveles de NCAM podrían estar implicados en las alteraciones cerebrales y daños cognitivos observados durante las secuelas de la malaria cerebral (Bentivoglio *et al.*, 2010; Idro *et al.*, 2010b; Medana *et al.*, 2007; Medana *et al.*, 2001; Miu *et al.*, 2008; Penet *et al.*, 2005).

Además, como NCAM puede interaccionar con BDNF y potenciar su acción, promoviendo la plasticidad sináptica y la supervivencia neuronal (Kiss *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2007; Vutskits *et al.*, 2001), la disminución observada de la expresión de *ncam* podría contribuir a una menor efectividad funcional de esta neurotrofina.

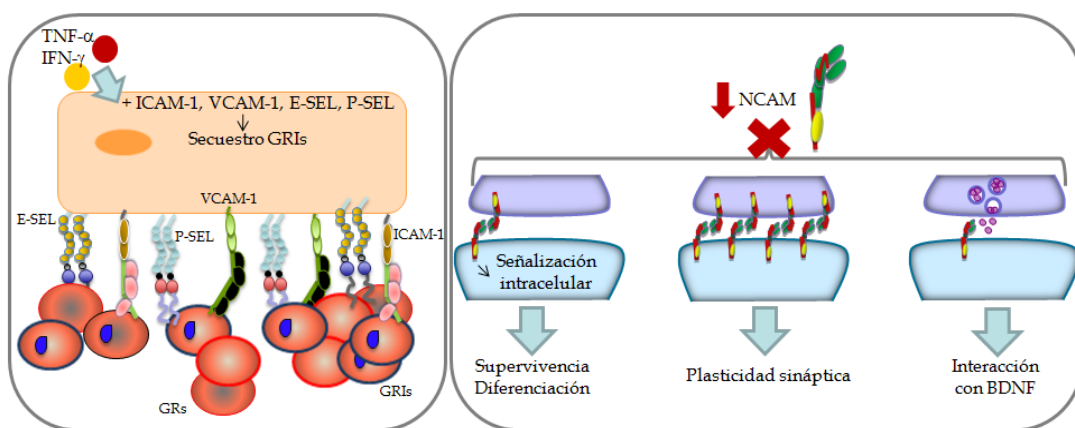


Figura 17.- Esquema hipotético de la implicación de NCAM y otras moléculas de adhesión durante el progreso de la malaria cerebral. TNF- α e IFN- γ inducen una expresión temprana de distintas moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina (E-SEL) y P-selectina (P-SEL), lo cual facilita el secuestro de glóbulos rojos en el endotelio del cerebro (panel izquierdo). Sin embargo, la disminución de los niveles de NCAM sugiere que esta molécula no está implicada en dicho proceso de citoadherencia, sino más bien en las alteraciones producidas durante esta complicación al no poder mediar la supervivencia y diferenciación celular, modular la plasticidad sináptica ni interaccionar correctamente con el BDNF (panel derecho). GRIs: glóbulos rojos infectados; GRs: glóbulos rojos.

Finalmente, cabe destacar que la secuencia de eventos moleculares observados en nuestro modelo durante el desarrollo de la malaria cerebral es similar a la respuesta que se produce tras un daño en el flujo cerebral, donde primero se activan "genes de respuesta temprana" como citoquinas y moléculas de adhesión; y otros sucesos como la muerte celular, la necrosis y la apoptosis ocurren más lentamente. Sin embargo, en este caso, factores de crecimiento y plasticidad se activan para la rehabilitación (Nagy *et al.*, 2002), al contrario de lo que hemos visto que puede estar ocurriendo en la malaria cerebral, donde estos mecanismos parecen estar dañados y su respuesta protectora dificultada.

La variabilidad observada en la naturaleza, gravedad y duración de las secuelas neurocognitivas que aparecen en los pacientes que sobreviven a la malaria cerebral, especialmente en niños menores de 5 años, sugiere que el daño cerebral que se produce afecta a distintas regiones y núcleos cerebrales. Por ello, en este trabajo se analizaron diferentes regiones de este órgano debido a las diferentes funciones fisiológicas que ejercen, ya que un daño específico regional puede conducir a un síntoma o secuela diferente (Lackner *et al.*, 2006; Marin-Garcia *et al.*, 2009; Penet *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en nuestro modelo mostraron que las mayores alteraciones se observan en las regiones de cerebelo y tallo, de forma similar a lo descrito por otros autores (Lacerda-Queiroz *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2006; Penet *et al.*, 2005), lo que podría explicar la elevada prevalencia de síntomas neurológicos en los individuos que la padecen como son ataxia, dificultades en el movimiento y equilibrio y alteraciones en el aprendizaje cognitivo (Armah *et al.*, 2005; Idro *et al.*, 2005; Penet *et al.*, 2005). Trastornos en otras regiones como córtex, tálamo e hipocampo también pueden contribuir al desarrollo de convulsiones, anormalidades motoras y alteraciones en los procesos relacionados con la memoria, lenguaje y atención asociados a la malaria cerebral y sus secuelas cognitivas (Guyton, 1994; Idro *et al.*, 2005; Purves *et al.*, 2001; Randall, 1999; Tórtora, 2002).

5.3.- METODOLOGÍA OXIPROTEÓMICA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO EN CEREBRO

La malaria se caracteriza por la generación de estrés oxidativo debido a la actividad metabólica del parásito y a la respuesta del hospedador frente a la infección (Becker *et al.*, 2004; Muller, 2004; van der Heyde *et al.*, 2006). Sin embargo, todavía existe gran controversia sobre la implicación que tiene el estrés oxidativo en el desarrollo de la malaria cerebral. Aunque algunos autores sugieren que durante la malaria cerebral se produce una acumulación de especies reactivas de oxígeno que conduciría a una situación de estrés oxidativo (Pino *et al.*, 2005; Postma *et al.*, 1996; Reis *et al.*, 2010; Wiese *et al.*, 2006), otros autores no observan diferencias en los niveles de marcadores este tipo de estrés en esta patología (Sanni *et al.*, 1999).

Tampoco se conoce el papel que el estrés oxidativo podría jugar en esta complicación cerebral, ya que, por un lado, podría ser beneficioso para combatir el crecimiento parasitario y mantener la homeostasis del hospedador, pero, por otro, también podría causar un importante daño celular en el cerebro (Ma, 2010; Pino *et al.*, 2005; Pino *et al.*, 2003a; Pongponratn *et al.*, 2003; Postma *et al.*, 1996), ya que este órgano es especialmente vulnerable al daño oxidativo debido a sus elevada demanda de oxígeno y sus bajos niveles de moléculas antioxidantes (Butterfield *et al.*, 2007).

Un entorno de estrés oxidativo en el cerebro puede producir daño en todo tipo de moléculas biológicas (Dalle-Donne *et al.*, 2003), siendo las proteínas una de sus principales dianas (Dalle-Donne *et al.*, 2006a). La oxidación de proteínas desempeña un papel fundamental en el desarrollo de múltiples enfermedades neurológicas, pudiendo estar también implicada en la malaria cerebral. Las proteínas pueden sufrir numerosas modificaciones covalentes tras la exposición a oxidantes. Algunos de estos cambios resultan del ataque directo de un radical libre a la molécula proteica, mientras que otros se producen indirectamente a través del ataque covalente de los productos resultantes de la oxidación (Shacter, 2000b). Entre las distintas modificaciones oxidativas que pueden sufrir las proteínas, la carbonilación es su producto mayoritario (Cecarini *et al.*, 2007; Shacter, 2000b).

La detección de grupos carbonilo como marcador del daño oxidativo se ha extendido en investigación biomédica debido a su acumulación en diversas enfermedades (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Así, dado que la identificación de grupos carbonilo puede ser un candidato idóneo como marcador del daño oxidativo (Dalle-Donne *et al.*, 2006b), el tercer objetivo de este trabajo fue caracterizar el método más adecuado para la detección de proteínas carboniladas en muestras de cerebro, para, posteriormente, analizar el entorno de estrés oxidativo en el contexto de la malaria cerebral e investigar potenciales marcadores que aparezcan en esta enfermedad.

El contenido de grupos carbonilo en proteínas individuales puede analizarse mediante la derivatización del extracto proteico con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que induce la formación de un producto derivado de la 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-proteína carbonilada), capaz de ser detectado mediante inmunotransferencia, donde las proteínas se separan en una electroforesis bidimensional, se transfieren a una membrana y los grupos DNP presentes son detectados mediante el uso de anticuerpos anti-DNP específicos (2D-oxyblot) (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Levine *et al.*, 1994; Shacter, 2000a; Shacter, 2000b).

Para la identificación de las proteínas oxidadas portadoras de grupos carbonilo, la imagen del 2D-oxyblot obtenida tras el inmunoensayo se compara, con la ayuda de programas informáticos, con la imagen que aparece cuando las proteínas se separan en un gel preparativo bidimensional teñido con azul de Commasie coloidal. Una vez que se determina la correspondencia de las proteínas del gel con las proteínas modificadas que se detectan en el 2D-oxyblot, éstas se escinden del gel preparativo, se digieren con tripsina y se analizan por espectrometría de masas (Butterfield *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta que el proceso de derivatización con DNPH podría afectar a la correcta identificación de las proteínas por espectrometría de masas, produciendo valores de confianza más bajos (Castegna *et al.*, 2002; Tezel *et al.*, 2005), muchos autores han utilizado muestras no tratadas con DNPH en los geles preparativos para la identificación proteica (Castegna *et al.*, 2002; Korolainen *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2006). Sin embargo, el proceso de derivatización también podría alterar el peso molecular y el punto isoelectrico de las proteínas (Dalle-Donne *et al.*,

2003), dificultando la correcta correspondencia de éstas entre el gel preparativo no tratado y el 2D-oxyblot procedente de muestras derivatizadas. Por ello, en un primer lugar nos planteamos si el uso de 2D-oxyblots de muestras derivatizadas se podría combinar con la utilización de geles preparativos procedentes de muestras no tratadas para la identificación proteica en el análisis oxiproteómico de tejidos cerebrales.

Con este fin se comparó, a partir de extractos de cerebelo de ratón, el perfil proteico obtenido mediante la separación bidimensional en gel de muestras derivatizadas con DNPH y muestras sin derivatizar. Aunque ambos tipos de aproximaciones produjeron una separación electroforética adecuada, se detectaron diferencias en el patrón proteico según el método utilizado, ya que cada tratamiento generó distintas áreas de enriquecimiento proteico, lo que dificultará seriamente la identificación por correspondencia entre las muestras del gel preparativo y las del 2D-oxyblot. Estos resultados excluyen por tanto la utilización de muestras no derivatizadas en el gel preparativo para la identificación de proteínas detectadas en 2D-oxyblots procedentes de muestras previamente derivatizadas.

Estos problemas podrían resolverse, en principio, si se procede a la derivatización de las proteínas con DNPH tras los procesos de electroforesis y posterior transferencia de los geles a la membrana (Conrad *et al.*, 2000). Con el fin de comprobar si efectivamente este protocolo mejoraba la detección e identificación de las proteínas carboniladas, se comparó esta aproximación con el método clásico en el que las muestras se tratan con DNPH antes de la electroforesis (Figura 18).

Los resultados obtenidos mostraron que los 2D-oxyblots procedentes de muestras proteicas derivatizadas una vez transferidas a las membranas eran menos reproducibles y presentaban un mayor fondo cuando se compararon con aquellos procedentes de muestras pre-tratadas con DNPH en el extracto proteico, lo que también se ha visto cuando se realizan estos ensayos en muestras no procedentes de cerebro (Talent *et al.*, 1998). Debido a que el mayor fondo del 2D-oxyblot complicaba la identificación de las proteínas modificadas en los geles preparativos, el mayor número de proteínas carboniladas se detectó cuando el extracto proteico se trataba con DNPH antes de la electroforesis.

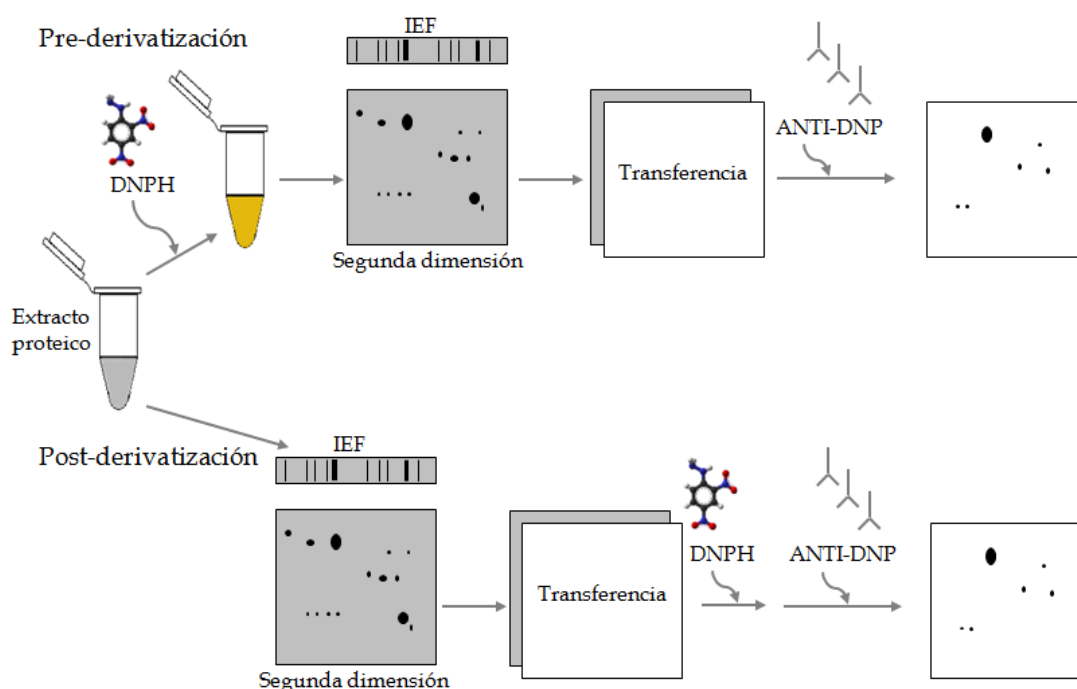


Figura 18: Esquema comparativo de los dos protocolos de oxiproteómica empleados. En la parte superior se representa el método de derivatización de la muestra con DNPH en el extracto proteico, mientras que la parte inferior esquematiza el método de derivatización proteica tras la separación electroforética.

Teniendo en cuenta que los mejores resultados se obtuvieron cuando se derivatizan las muestras proteicas antes de su separación mediante electroforesis y con el fin de estudiar si ese pre-tratamiento produce alteraciones en la identificación de las proteínas por espectrometría de masas, procedimos a comparar estadísticamente la calidad de la identificación de un grupo de proteínas idénticas que aparecieron carboniladas en ambos tipos de geles, pre-tratados y no tratados. Ambas aproximaciones produjeron una identificación correcta con valores de confianza similares, como han observado otros autores en muestras de adipocitos (Singh *et al.*, 2007).

Sin embargo, el número de proteínas carboniladas comunes detectadas por ambos métodos era bajo, lo cual podría justificar la utilización combinada de ambas aproximaciones en proteómica redox. No obstante, pensamos que esta diferencia de cantidad podría ser debida a los distintos patrones observados en ambos tipos de geles, más que a una diferente capacidad de detección de cada método. Esta variabilidad entre los patrones obtenidos para cada una de las aproximaciones

experimentales utilizadas puede ser resultado de una diferente precipitación proteica (Reinheckel *et al.*, 2000) o de diferencias en su movilidad electroforética según las proteínas estén o no unidas a DNP.

En este contexto, varios autores sugieren que el tratamiento de las proteínas con DNPH modifica su punto isoelectrico y su peso molecular (Conrad *et al.*, 2000; Reinheckel *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2007; Talent *et al.*, 1998), lo cual justificaría una baja correspondencia entre las proteínas carboniladas detectadas por cada uno de los métodos. Sin embargo, en nuestro caso no observamos que el proceso de derivatización afecte a la electroforesis bidimensional, ni el punto isoelectrico, ni el peso molecular de las proteínas modificadas pre-derivatizadas cuando se comparan con las no tratadas, lo que concuerda con resultados descritos por otros autores (Castegna *et al.*, 2002; Tezel *et al.*, 2005).

Aun así, no podemos descartar que un pequeño efecto de posición prevenga la correcta correspondencia de determinadas proteínas entre geles procedentes de muestras derivatizadas y no derivatizadas. Con el fin de analizar este potencial efecto, se procedió a identificar mediante espectrometría de masas distintas proteínas que aparecieran modificadas por ambos métodos en regiones cercanas del gel preparativo pero que no presentaran correspondencia mediante los programas de imagen empleados. Los resultados de espectrometría de masas mostraron a que al menos la mitad de estas proteínas correspondían con la misma molécula, por lo que parece probable que pequeñas diferencias de posición entre ambos tipos de geles sí afecten a la correspondencia de proteínas mediante los programas de imagen utilizados. Este hecho podría explicar el reducido número de proteínas comunes detectadas por ambos métodos.

Por tanto, y en base a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, la derivatización de las muestras antes de la separación electroforética parece ser el mejor método para analizar la carbonilación proteica en tejidos cerebrales. Esta aproximación, además de presentar las ventajas expuestas anteriormente, es menos agresiva para la muestra y previene los procesos oxidativos durante el almacenaje y manipulación de las mismas.

5.4.- ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO NEUROCOGNITIVO EN LA MALARIA CEREBRAL

La producción de especies reactivas de oxígeno es esencial para la activación de ciertas vías de señalización, el mantenimiento de la homeostasis celular, la estimulación de la proliferación celular, la defensa frente a patógenos y, quizás, para la eliminación de restos celulares. Por el contrario, su acumulación excesiva en un momento determinado puede dañar la estructura celular y alterar la función de los tejidos. Así, el equilibrio homeostático del estrés oxidativo es un factor crítico en el desarrollo de diferentes enfermedades neurológicas (Calabrese *et al.*, 2007), aunque su implicación en el desarrollo de la malaria cerebral todavía plantea serias dudas.

Cuando las especies reactivas de oxígeno se acumulan en el cerebro pueden producir alteraciones cognitivas (Serrano & Klann, 2004), de ahí que un aumento en la presencia de estas moléculas podría explicar algunos de los síntomas y secuelas que aparecen en la malaria cerebral. En otras enfermedades neurológicas, donde también se ven afectadas funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria y funciones motoras como la fuerza, equilibrio y coordinación, se ha observado que existe una acumulación de especies reactivas de oxígeno (Droge & Schipper, 2007). Así, las alteraciones neurológicas asociadas a la malaria cerebral podrían estar mediadas por las propiedades neuromoduladoras de las especies reactivas de oxígeno (Allen & Tresini, 2000) o su capacidad de producir daño en distintas poblaciones celulares del cerebro (Becker *et al.*, 2004; Buffinton *et al.*, 1988; Chakravorty *et al.*, 2008; Hunt *et al.*, 2006; Pino *et al.*, 2005; Pongponratn *et al.*, 2003; Postma *et al.*, 1996; Wiese *et al.*, 2006).

La idea de que las especies reactivas de oxígeno pueden contribuir al desarrollo de los trastornos cognitivos producidos durante la malaria cerebral se ve apoyada por el papel protector que el tratamiento con distintos antioxidantes ejerce frente al progreso de dicha patología, algunos de los cuales incluso tienen capacidad de prevenir las alteraciones cognitivas asociadas a las secuelas de esta enfermedad (Becker *et al.*, 2004; Postma *et al.*, 1996; Reis *et al.*, 2010; Taoufiq *et al.*, 2006; Thumwood *et al.*, 1989).

Entre los distintos fenómenos descritos que podrían producir la acumulación de especies reactivas de oxígeno durante el desarrollo de la malaria cerebral, en nuestro modelo observamos liberación de citoquinas, inducción de moléculas de adhesión endotelial (Bartosz, 2009; Hensley *et al.*, 2000; Tripathi *et al.*, 2006; Zapata-Zapata & Blair-Trujillo, 2003) y adhesión de glóbulos rojos infectados a las células endoteliales (Pino *et al.*, 2005; Taoufiq *et al.*, 2006). Por otra parte, también hay que tener en cuenta que las propias especies reactivas de oxígeno producidas y el estrés oxidativo pueden inducir directamente citoquinas como TNF- α y moléculas de adhesión como ICAM y VCAM (Allen & Tresini, 2000; Ma, 2010). Por último, y al igual que sucede en otras enfermedades neurológicas (Maier & Chan, 2002), los sistemas de defensa antioxidante podrían fallar durante el transcurso de la malaria cerebral (Postma *et al.*, 1996) por un exceso de producción local de especies reactivas de oxígeno.

Por todo ello, nuestro cuarto objetivo fue evaluar el escenario de estrés oxidativo durante el curso del daño cognitivo asociado a la malaria cerebral mediante el análisis de distintos marcadores de estrés y sistemas de defensa presentes en distintas regiones del cerebro del hospedador en nuestro modelo experimental en cuatro estadios, clasificado según el desarrollo de los síntomas neurológicos característicos de la enfermedad.

En primer lugar, se llevaron a cabo estudios de expresión y actividad del sistema superóxido dismutasa/catalasa. Las tres isoformas de la SOD reducen el anión superóxido a peróxido de hidrógeno, el cual, a su vez, es reducido a agua mediante la acción de la catalasa. De esta forma, ambas enzimas impiden la transformación de sus sustratos en el radical hidroxilo y la formación de peroxinitrito mediante la reacción entre el anión superóxido y el óxido nítrico (Pino *et al.*, 2003a; Postma *et al.*, 1996).

Los estudios llevados a cabo en nuestro trabajo pusieron de manifiesto una disminución progresiva en la expresión de ambos sistemas que cursa de forma paralela a la adquisición de los síntomas neurológicos de la enfermedad. Esta disminución transcripcional se observó en todas las regiones cerebrales analizadas, siendo, cerebelo y tallo las áreas más afectadas. Sin embargo, a pesar de los cambios

significativos a nivel de transcripción, no se detectaron variaciones en el contenido proteico de las mismas enzimas, lo que podría explicarse por la disfunción del proteasoma y secuestro por parte del inmunoproteasoma observados en nuestro modelo de malaria cerebral experimental. Así, si ambas enzimas se estuvieran acumulando como proteínas mal plegadas o agregadas, su variación a nivel proteico no se detectaría con las técnicas utilizadas pero serían disfuncionales.

Con el fin de investigar si efectivamente los niveles de SOD y CAT funcionales estaban disminuidos durante el desarrollo de la malaria cerebral, se procedió a ensayar la actividad enzimática de ambas proteínas en el cerebelo y el tallo de los animales infectados cuando se encuentran en el estadio más severo de la enfermedad. Los valores de actividad de ambas enzimas mostraron una disminución significativa en las dos regiones analizadas, lo que apoya la disminución observada a nivel transcripcional y traduccional y la posible acumulación de proteínas a consecuencia de la disfunción del proteasoma, que dificultaría el recambio proteico cerebral en una situación de emergencia.

Alteraciones similares en la expresión y actividad de ambas enzimas se han descrito en otras situaciones patológicas asociadas a una disfunción neurológica, por lo que cabe pensar que las variaciones en la actividad catalítica de cualquiera de ellas podrían ser una de las posibles causas de la muerte neuronal observada en este tipo de enfermedades (Brown-Borg & Rakoczy, 2000; Maier & Chan, 2002; Marcus *et al.*, 1998), lo cual se haría extensivo en la malaria cerebral. Además, también se ha visto que su administración terapéutica o sobreexpresión ejerce funciones protectoras en distintas situaciones patológicas (Huang *et al.*, 2001; Maier & Chan, 2002; Noshita *et al.*, 2001), al prevenir el daño celular (Postma *et al.*, 1996) y prolongar la supervivencia *in vivo* (Maier & Chan, 2002) gracias a sus acciones neuroprotectoras (Gaspar *et al.*, 2009; Maier & Chan, 2002). La SOD-2 protege también frente a la citotoxicidad inducida por citoquinas como TNF- α (Mates, 2000) y se ha demostrado que tanto la SOD-2 como la SOD-3 son capaces de potenciar la memoria y el aprendizaje (Dumont *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2006; Levin, 2005). Por ello, la disfunción observada en estos sistemas antioxidantes podría estar relacionada con los síntomas asociados a la malaria cerebral y sus secuelas.

En el contexto de esta complicación neurológica, la disfunción de la SOD podría ser fundamental. Su suplementación protege frente al estrés oxidativo inducido por el parásito *in vitro* (Chakravorty *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2005; Taoufiq *et al.*, 2006) y presenta distintos mecanismos protectores frente a esta patología cerebral debido a sus propiedades antioxidantes, anti-parasíticas, anti-inflamatorias, y anti-citoadherentes (Ma, 2010; Pino *et al.*, 2005; Taoufiq *et al.*, 2006). Con respecto a esta última cualidad, al disminuir los niveles de moléculas de adhesión, reduciría también la adhesión de eritrocitos infectados al endotelio. La catalasa, al igual que la SOD, además de ejercer acciones antioxidantes, también está implicada en procesos de señalización celular, pudiendo inhibir la transducción de señales vía factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés, “platelet derived growth factor”) (Hensley *et al.*, 2000). En este sentido, durante la malaria cerebral, se detectan alteraciones en los niveles de PDGF a nivel cerebral (Armah *et al.*, 2007). Debido a que la administración de ambas enzimas ha mostrado un efecto protector frente al desarrollo de la malaria cerebral murina gracias a su actividad antioxidante (Postma *et al.*, 1996; Taoufiq *et al.*, 2006), su suplementación o inducción podría mejorar el pronóstico y las complicaciones de esta enfermedad.

Estudios recientes ponen de manifiesto que tanto la actividad de la SOD como de la CAT están relacionadas con los niveles de la HSP70 (Choi *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010), por lo que esta última molécula podría estar influyendo en las variaciones que observamos en ambas enzimas antioxidantes. Las proteínas de choque térmico funcionan como chaperonas que ayudan al ensamblaje, plegamiento y translocación de otras proteínas en la célula. Bajo condiciones de estrés, esta familia de proteínas parece ser crítica para prevenir la acumulación y agregación de moléculas proteicas mal plegadas, así como para facilitar el plegamiento y eliminación de las dañadas (Ma, 2010).

Con el fin de estudiar si HSP70 está relacionada con estos procesos, procedimos a analizar sus niveles de expresión en distintas regiones cerebrales de los animales infectados durante el curso de la malaria cerebral murina. Los resultados obtenidos mostraron una disminución gradual de la expresión de esta proteína en todas las regiones analizadas, siendo, nuevamente, las regiones más afectadas el cerebelo y el tallo.

La disminución de la expresión de *hsp70* observada durante el desarrollo de la malaria cerebral podría contribuir a la disminución en la actividad de la SOD y CAT descritas en este estudio, ya que se ha visto que ratones deficientes en *hsp70* muestran una disminución en la actividad de las isoformas SOD-1 y SOD-2 (Choi *et al.*, 2005) y se ha sugerido que HSP70 podría modular la respuesta al daño incrementando la actividad de la CAT (Romero *et al.*, 2010). Por otro lado, también se ha descrito que cambios en la expresión de *sod* se correlacionan con la inducción a nivel de ARN mensajero de *hsp70* (Allen & Tresini, 2000).

Debido a que una de las funciones de esta chaperona es prevenir la acumulación y agregación proteica (Calabrese *et al.*, 2007; Giffard *et al.*, 2008), su disminución podría estar contribuyendo, junto con los cambios en el proteasoma, a la acumulación de proteínas mal plegadas. Este fenómeno ayuda a explicar la falta de correspondencia entre la disminución de *hsp70* a nivel de ARN mensajero que observamos y el aumento de la misma descrito a nivel de proteína en cerebros de pacientes de malaria cerebral y no cerebral mediante inmunohistoquímica (Medana *et al.*, 2001), a pesar que este efecto en humanos podría ser causa post-mortem, o bien diferencial entre ambas especies.

La disminución de la expresión de *hsp70* podría contribuir a la patogénesis de la malaria cerebral mediante otras vías, como es el caso de la muerte celular, ya que esta proteína parece mediar efectos cito y neuroprotectores (Choi *et al.*, 2005; Giffard *et al.*, 2008). Así, su disminución podría favorecer también el daño observado en algunas poblaciones cerebrales durante la malaria cerebral y de esta forma estar relacionada con las alteraciones cognitivas producidas en ella. Además, como esta familia de proteínas puede disminuir la producción de citoquinas pro-inflamatorias y mediar en la respuesta frente a la inflamación (Giffard *et al.*, 2008), la disminución de esta molécula en nuestro modelo de estudio podría estar jugando un papel indirecto secundario al daño producido por la neuroinflamación durante la malaria cerebral.

Las HSPs forman parte de un grupo de genes de respuesta frente al estrés oxidativo denominado “vitagenes”, en el que también se incluyen las tioredoxinas (Calabrese *et al.*, 2007). La TRX-1 es la forma citosólica de esta enzima, se expresa

ampliamente en cerebro y tiene diversas funciones antioxidantes: (i) es capaz de actuar por sí misma como detoxificador de especies reactivas de oxígeno, eliminando el oxígeno singlete, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno; (ii) elimina peróxidos de forma concertada con peroxiredoxinas y TRX reductasas; y (iii) ayuda a estas últimas a reducir los puentes disulfuro de las proteínas (Calabrese *et al.*, 2007; Patenaude *et al.*, 2005).

Con el fin de estudiar si esta enzima también se ve alterada durante el transcurso de la malaria cerebral, en este trabajo procedimos a analizar sus niveles de expresión en diversas regiones cerebrales, durante los cuatro estadios neurológicos de la enfermedad. Los resultados obtenidos pusieron de nuevo de manifiesto, y al igual que en las proteínas hasta ahora analizadas, una reducción gradual en sus niveles de ARN mensajero de forma más acusada en cerebelo y tallo. La tiorredoxina parece ser un factor importante en el desarrollo de diversas situaciones patológicas (Patenaude *et al.*, 2005), ya que juega un papel esencial en los procesos de transducción de señales, transcripción (Allen & Tresini, 2000), crecimiento celular, apoptosis, diferenciación y proliferación (Patenaude *et al.*, 2005), además de que se ha asociado con la supervivencia neuronal (Calabrese *et al.*, 2007) y se ha sugerido su implicación en la regeneración cerebral después del daño sufrido (Patenaude *et al.*, 2005). Así, su disminución transcripcional podría contribuir al daño celular y a la neurodegeneración observada durante la malaria cerebral, ya que se verían afectados una amplia variedad de procesos funcionales.

Todos los cambios de expresión observados podrían estar mediados por una serie de factores de transcripción implicados en regular la respuesta antioxidante de las células. En este contexto, el factor de transcripción XBP1 (del inglés, "X-box-binding protein"), PARK7 (del inglés, "Parkinson disease 7") y la familia de factores de transcripción FOXO, subgrupo de la familia de factores de transcripción "Forkhead box", son los encargados de regular la expresión de distintos genes antioxidantes (Liu *et al.*, 2009; Ma, 2010; Zhou *et al.*, 2011).

Con el fin de estudiar si estos factores de transcripción pueden estar implicados en las alteraciones de los sistemas antioxidantes observadas en nuestro modelo, se determinaron sus niveles de ARN transcripcionales en diferentes

regiones cerebrales del hospedador durante el transcurso de la patología. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una disminución de *xbp1*, *park7* y *foxo3* progresiva y concomitante con la aparición de los síntomas en todas las regiones analizadas y, en la mayor parte de ellas en el caso de *foxo1*.

El factor de transcripción XBP1 también confiere resistencia frente al estrés oxidativo, al menos, a través de la inducción de la catalasa. Debido a que la delección de *xbp1* produce la disminución de esta proteína así como la de SOD-1 y TRX-1 (Liu *et al.*, 2009), la disminución observada durante la malaria cerebral podría ser responsable de la menor expresión vista en estos genes, sobre todo en el caso del que codifica para la catalasa, ya que su transcripción está muy vinculada a la de este factor. Sin embargo, como al parecer estos genes no son dianas directas de *xbp1*, la regulación de los mismos por parte de XBP1 podría llevarse a cabo de forma indirecta (Liu *et al.*, 2009). Por otro lado, XBP1 también parece ser un factor clave en la respuesta frente a proteínas mal plegadas, facilitando el correcto plegamiento, procesamiento, exportación y degradación de las mismas (Glimcher, 2010). Por tanto, su disminución también podría estar contribuyendo a la acumulación de proteínas mal plegadas que pensamos ocurre durante esta patología. La disminución de XBP1 también podría estar implicada en el desarrollo de la malaria cerebral mediante la intervención en dos mecanismos adicionales: (i) disminuyendo los niveles de BDNF de forma acoplada a la disminución de HSP70 (Gupta *et al.*, 2010)) y (ii) contribuyendo al mantenimiento de elevados niveles de TNF- α durante el transcurso de la enfermedad (Glimcher, 2010).

PARK7 puede inducirse en condiciones de estrés oxidativo y funciona como chaperona, antioxidante y co-activador transcripcional (Ma, 2010; Thomas & Beal, 2007), por lo que su disminución puede contribuir directamente a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Thomas & Beal, 2007) y por tanto, a las lesiones observadas en la malaria cerebral ya que se ha visto que ratones deficientes en esta proteína desarrollan déficits motores (Chen *et al.*, 2005; Goldberg *et al.*, 2005) y que su sobreexpresión protege frente a una gran variedad de daños producidos por el estrés oxidativo gracias a su papel neuroprotector (Moore *et al.*, 2005; Thomas & Beal, 2007). Por otro lado, y puesto que esta proteína también funciona como chaperona en la prevención de formación de agregados proteicos (Batelli *et al.*, 2008;

Thomas & Beal, 2007; Zhou *et al.*, 2011), su disminución podría estar mediando la acumulación de proteínas propuesta a través de una menor inducción de *hsp70* (Batelli *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2011). Finalmente, PARK7 también podría estar implicado en la disminuida actividad de la SOD-1, ya que recientemente se ha visto que media la activación de esta enzima (Xu *et al.*).

La disminución de *foxo3* y *foxo1* que observamos podría estar contribuyendo a la disminución de la expresión de *sod-2* y *cat*, procesos que también se han propuesto en otras enfermedades (Collins *et al.*, 2009; Ma, 2010). La Figura 19 resume la posible implicación en el desarrollo de la malaria cerebral que sugerimos para estas moléculas, junto con los sistemas antioxidantes que regulan.

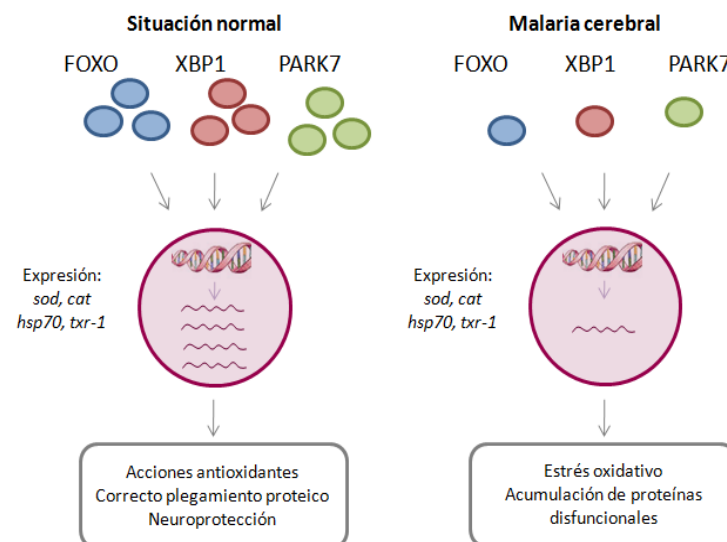


Figura 19.- Esquema de la regulación del sistema antioxidante en la malaria cerebral. A partir de la descripción experimental de efectos de FPXP, XBP1 y PARK7 se propone un modelo de señalización y control de los genes involucrados en la respuesta antioxidante que han sido estudiados en el presente trabajo.

Los defectos detectados en algunos componentes del sistema antioxidante del hospedador podrían estar conduciendo a una situación de acumulación de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo (Postma *et al.*, 1996). Con el fin de analizar a qué nivel las alteraciones observadas en estos mecanismo de defensa están perturbando el equilibrio redox intracelular durante la malaria cerebral, procedimos a analizar la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la carbonilación de proteínas en los estadios más avanzados de la enfermedad como

marcadores de daño oxidativo. Para llevar a cabo estos análisis se eligieron sólo las regiones cerebrales de cerebelo y tallo, debido a que en los ensayos previamente descritos realizados con nuestro modelo fueron las que mostraron un mayor acúmulo de carga parasitaria y las variaciones más elevadas en los niveles de expresión tanto de factores antioxidantes como neuroprotectores.

Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio no mostraron diferencias significativas a nivel de acumulación de especies reactivas de oxígeno entre animales control y animales infectados en ninguna de las regiones analizadas. Sospechando que la potencial acumulación de especies reactivas de oxígeno podría estar enmascarada por su rápida reacción con algunas de sus dianas celulares como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Pino *et al.*, 2005; Pino *et al.*, 2003a; Postma *et al.*, 1996), procedimos a analizar el patrón de carbonilación proteica como marcador de daño oxidativo más estable. Los ensayos de oxiproteómica pusieron de manifiesto la ausencia de diferencias en este patrón de carbonilación proteico, número de proteínas carboniladas o contenido total de proteínas modificadas por DNPH cuando se comparan extractos procedentes de cerebros de animales infectados con los animales control.

Nuestros resultados concuerdan con los descritos por otros autores que tampoco ven diferencias en contenido total de carbonilación proteica de ratones con malaria cerebral (Sanni *et al.*, 1999). Estos datos sugieren que al menos la carbonilación de proteínas no parece jugar un papel importante durante esta patología severa. Aunque estudios previos han descrito que existen niveles elevados de peroxidación lipídica en el líquido cefalorraquídeo de pacientes que sufren de malaria cerebral (Postma *et al.*, 1996), en el modelo experimental murino solamente se han observado, a nivel cerebral, discretas alteraciones en los niveles de peroxidación lipídica (Reis *et al.*, 2010) y un mayor grado de oxidación del ADN en las células endoteliales (Wiese *et al.*, 2006).

La producción de especies reactivas de oxígeno puede producirse de forma localizada (Siegel *et al.*, 1999), proceso que puede verse favorecido por una distribución celular diferencial de los distintos sistemas antioxidantes (Maier & Chan, 2002). De esta forma, algunos autores sugieren que los efectos perjudiciales de

las especies reactivas de oxígeno no sólo dependen de la cantidad acumulada, sino del lugar donde se generan (Pino *et al.*, 2005; Postma *et al.*, 1996). Así, los cambios que pudieran estar produciéndose en la carbonilación proteica, lo harían también a nivel local, dificultando su detección mediante las aproximaciones empleadas. Con el fin de comprobar si existen cambios locales a nivel de oxidación proteica, analizamos, mediante técnicas inmunohistoquímicas la distribución de las proteínas carboniladas en cerebro de ratones infectados. Las imágenes obtenidas no mostraron cambios en el patrón de distribución de la carbonilación proteica, lo que prácticamente descarta una acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno.

Dado que las especies reactivas de oxígeno son requeridas para algunos procesos fisiológicos normales, cuando se produce la activación de las defensas antioxidantes y el contenido de las mismas se reduce a niveles subóptimos, la célula utiliza factores reguladores negativos que contrarrestan estos mecanismos (Mates, 2000). A la vista de los resultados obtenidos en nuestros ensayos, donde se pone de manifiesto una disminución transcripcional y funcional en varios de los sistemas antioxidantes que no aparece acompañada de una situación de estrés oxidativo, nos planteamos si en el desarrollo de la malaria cerebral pudiera estar sucediendo que la disminución de algunos sistemas antioxidantes estuviera acompañada de la inducción compensatoria de otros mecanismos, que evitaran la acumulación de especies reactivas de oxígeno.

Debido a la importancia del sistema de defensa dependiente de glutathione (Mates, 2000), cabe pensar que la GPX pudiera participar compensando la disminución de las enzimas TXR y CAT, al presentar una mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que ésta última. Por otro lado, el mismo efecto podría estar sucediendo con la HO-1, enzima que elimina el hierro libre y cuyos productos, bilirrubina y monóxido de carbono, ejercen también acciones antioxidantes, protegiendo frente a los efectos citotóxicos de diversos oxidantes (Calabrese *et al.*, 2007). Por ello, teniendo en cuenta el papel que ejercen ambas enzimas, nos propusimos estudiar su expresión en el transcurso de la malaria cerebral en distintas regiones del cerebro de los ratones infectados en nuestro modelo.

Los resultados obtenidos mostraron que en el caso de la GPX existe una gran variabilidad en el comportamiento de esta enzima dependiendo de la región cerebral analizada. Algunos autores han observado resultados similares en muestras de cerebro bajo situaciones de estrés oxidativo inducidas por metales pesados (Hussain *et al.*, 1997). En nuestro estudio, exceptuando la marcada disminución observada en el tallo, la mayoría de las regiones cerebrales ensayadas mostraron una inducción temprana de expresión de la enzima, lo que podría contribuir a detoxificar las especies reactivas de oxígeno y a que la cantidad total de éstas no varíe durante la enfermedad, ya que la GPX puede reducir también otros hidroperóxidos orgánicos además del peróxido de hidrógeno (Dringen *et al.*, 2005). El distinto patrón de expresión que presenta este gen cuando se compara con el observado en el resto de las enzimas antioxidantes estudiadas podría explicarse a la vista de nuestros propios resultados, ya que el déficit de *xbp1* disminuye los niveles de *txr-1*, *sod* y *cat* sin afectar la expresión de *gpx* (Liu *et al.*, 2009). Se conocen casos de otras enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer, donde también se ha descrito un efecto compensatorio de esta enzima (Calabrese *et al.*, 2007).

Los ensayos realizados con la HO-1 también mostraron un incremento progresivo en la expresión del gen que la codifica asociado al desarrollo de la patología y en todas las regiones analizadas. Su inducción también se ha visto en otras enfermedades neurológicas, como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington (Orozco-Ibarra *et al.*, 2006) y podría suponer un efecto compensatorio frente al entorno de estrés oxidativo. En este sentido, cabe resaltar que la inducción de esta enzima es una de las respuestas celulares más tempranas frente al daño tisular, debido a su importante papel neuroprotector (Calabrese *et al.*, 2007). Por otra parte, la expresión de la HO-1 se puede inducir también por citoquinas (Hunt *et al.*, 2006) con el fin de prevenir procesos neuroinflamatorios (Hunt & Stocker, 2007; Pamplona *et al.*, 2007).

Durante el transcurso de la malaria cerebral esta enzima parece jugar un papel importante ya que en pacientes que la sufren se ha visto una sobreexpresión de la misma, aunque algunos estudios indican que este hecho sólo se observa en una parte de los pacientes y no parece ser específica de la complicación cerebral (Hunt *et*

al., 2006; Medana *et al.*, 2001; Schluesener *et al.*, 2001). En modelos murinos de malaria cerebral experimental que cursan esta patología, también se ha descrito una mayor expresión de esta enzima (Oakley *et al.*, 2008; Pamplona *et al.*, 2007) y se ha demostrado que su inducción ejerce un papel protector frente al desarrollo de la enfermedad (Ferreira *et al.*, 2008; Pamplona *et al.*, 2007), siendo central en el mecanismo protector de individuos con anemia falciforme (Ferreira *et al.*, 2011).

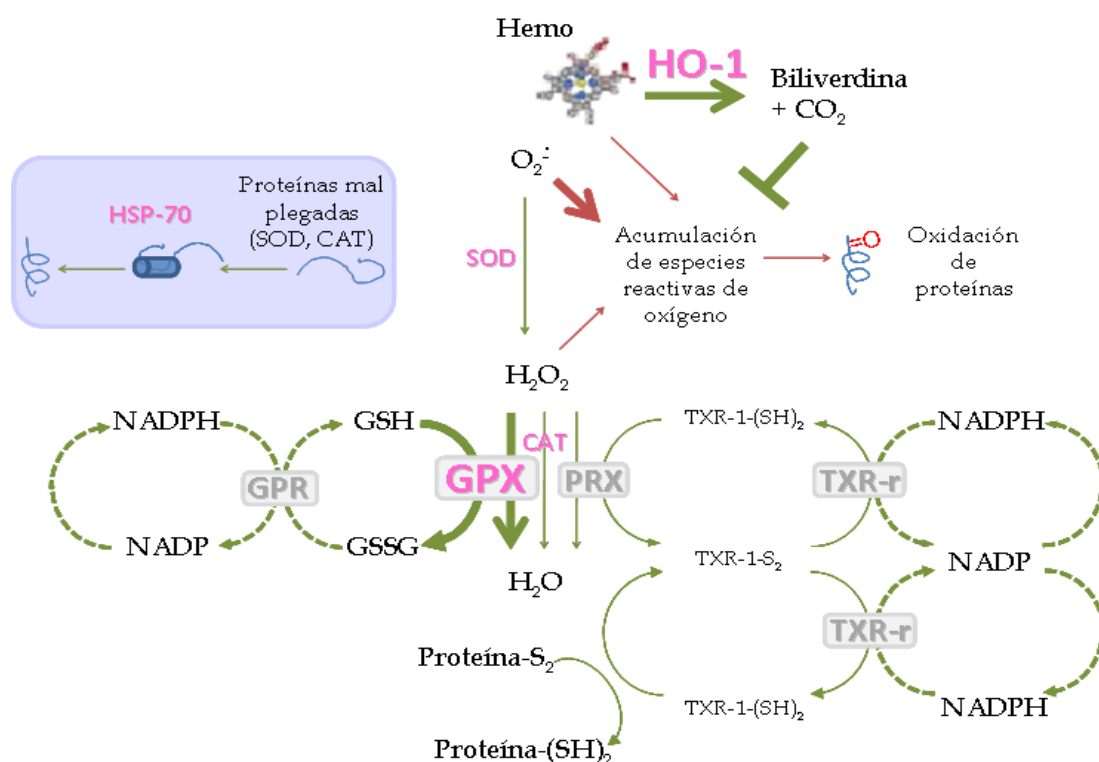


Figura 20.- Esquema de las alteraciones en el sistema redox intracelular durante la malaria cerebral. La disminución de SOD, CAT, TXR-1 y HSP70 del hospedador se ve compensada mediante la inducción de la expresión de *ho-1* y *gpx*. TXR-r: tioredoxina reductasa; GPR: glutation reductasa; PRX: peroxiredoxina; GSH/GSSG: glutation reducido/oxidado.

Las reacciones que favorecen la producción de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo se representan en rojo, mientras que aquellas con efectos antioxidantes se representan en verde. El mayor o menor grosor de las flechas indica si la reacción está más o menos favorecida en nuestro estudio de malaria cerebral. El mayor o menor tamaño de letra representa el aumento o disminución observado de las moléculas antioxidantes.

Una visión global de nuestros estudios parece indicar que, durante el curso de la malaria cerebral, se está produciendo un efecto compensatorio entre los mecanismos de defensa antioxidante, que impide la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Figura 20). Aunque en el presente trabajo no observemos un incremento de las mismas, el daño que producen puede ser debido a que sus mecanismos de acción son complejos y que median diversas situaciones patológicas

dependiendo tanto de la dosis como del contexto celular (Ma, 2010), de forma que pequeños cambios en su nivel podrían contribuir a las alteraciones observadas en la expresión génica de otras enzimas. Por ello, es necesario un mayor conocimiento de la interacción entre las especies reactivas de oxígeno y estas vías transcripcionales en la patogénesis de esta enfermedad. Finalmente, nuestros resultados pueden explicar, tanto el efecto protector de los sistemas antioxidantes previamente descrito (Becker *et al.*, 2004; Postma *et al.*, 1996; Reis *et al.*, 2010; Taoufiq *et al.*, 2006; Thumwood *et al.*, 1989), como la falta de acumulación de especies reactivas de oxígeno también descrita por otros (Sanni *et al.*, 1999).

5.5.- MOLÉCULAS NEUROPROTECTORAS Y REDOX COMO DIANAS TERAPÉUTICAS DURANTE LA MALARIA CEREBRAL

Estudios previos llevados a cabo en modelos animales afectados de diversas enfermedades asociadas a alteraciones motoras y a procesos de aprendizaje y memoria han demostrado que la administración del factor neuroprotector BDNF reduce los procesos neurodegenerativos que acontecen, lo que le confiere un potencial terapéutico considerable (Zuccato & Cattaneo, 2009), que podría extenderse a ser utilizado como terapia coadyuvante durante el tratamiento antimalárico de la malaria cerebral.

Recientemente, se ha descrito que el acetato de glatiramer, un compuesto que aumenta la expresión de BDNF en el cerebro de ratones (Aharoni *et al.*, 2005) reduce el riesgo de desarrollo de malaria cerebral cuando se utiliza en un modelo murino experimental de esta patología (Lackner *et al.*, 2009). Las estrategias utilizadas para potenciar el efecto neuroprotector del BDNF están dirigidas hacia el desarrollo de fármacos capaces de aumentar la biosíntesis y liberación de esta neurotrofina en el paciente. Entre ellos se encuentran, por ejemplo, ampakinas, memantina, riluzol (Fumagalli *et al.*, 2006a; Fumagalli *et al.*, 2006b), antidepresivos como la paroxetina y sertralina (Duan *et al.*, 2008) y agonistas de los receptores de dopamina D3, como el pramipexole. Además, si tenemos en cuenta que este último compuesto también media en los procesos neuroprotectores mediante la regulación del proteasoma (Albrecht & Buerger, 2009; Le & Jankovic, 2001), su uso frente a la

malaria cerebral tendría un valor añadido ya que según nuestros ensayos este sistema celular también está alterado durante el curso de esta enfermedad.

Otro candidato idóneo para su estudio con potencial aplicación clínica en la malaria cerebral sería un mimético que se ha desarrollado a partir de la molécula NCAM (Klementiev *et al.*, 2007) cuyo uso terapéutico en humanos ha superado ya la fase I de ensayos clínicos (Anand *et al.*, 2007) y que actualmente se está evaluando en pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer.

Finalmente, y a la vista de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, la potenciación de los mecanismos de actividad antioxidante también podría utilizarse como posible tratamiento para prevenir la malaria cerebral. Iones como el litio y el zinc inducen la expresión de genes antioxidantes como *sod-1*, *sod-2*, catalasa, thiorredoxina peroxidasa y *hsp70* (Chiu & Chuang, 2010; Wu *et al.*, 2011), además de potenciar la acción del BDNF (Corona *et al.*, 2010; Fumagalli *et al.*, 2006a), por lo que podrían resultar compuestos interesantes para el tratamiento de esta enfermedad.

Por el momento, se ha descrito que el suplemento de SOD y catalasa puede resultar protector durante la malaria cerebral murina (Postma *et al.*, 1996; Taoufiq *et al.*, 2006). Debido a que la SOD es inestable, no penetra las células y provoca una importante respuesta inmune, se han desarrollado una amplia variedad de conjugados de esta enzima que presentan una vida media en circulación más alta, así como compuestos que mimetizan su actividad (Mates, 2000). Algunos de éstos ya han mostrado un efecto protector frente al desarrollo de esta forma severa de malaria en un modelo experimental murino (Taoufiq *et al.*, 2006). Por otro lado, también se han desarrollado compuestos que mimetizan la actividad de la catalasa (Mates, 2000), con potencial para el tratamiento de esta patología. Recientemente se ha visto que la curcumina ejerce un papel protector en el desarrollo de la malaria cerebral (Waknine-Grinberg *et al.*, 2010), efecto que podría estar justificado por el potencial de incrementar la HO-1 y la respuesta de choque térmico que tiene este compuesto (Calabrese *et al.*, 2007). Por ello, otras moléculas antioxidantes con efectos similares, como son la acetilcarnitina y el ácido ferrúlico, podrían resultar drogas interesantes para prevenir la malaria cerebral.

Con estos antecedentes y según los resultados mostrados en este trabajo, nuestro estudio abre nuevas vías para el tratamiento de la malaria cerebral y sus secuelas mediante el descubrimiento de moléculas neuroprotectoras y factores redox que desempeñen un papel importante en el desarrollo de la malaria cerebral y podrían ser utilizadas como potenciales dianas terapéuticas. Además, a partir de nuestro modelo de enfermedad clasificado en cuatro estadios según la sintomatología neurológica, se puede caracterizar de forma más precisa el momento en el que comienzan a producirse dichas alteraciones, lo que ayudaría a determinar la pauta de administración farmacológica más adecuada para cada tratamiento específico experimental. Estos ensayos permitirán seleccionar de forma más eficiente las fases de tratamiento de la enfermedad y potenciar el efecto de los que se utilizan en la actualidad, impidiendo su desarrollo o minimizando las secuelas que padecen.

6. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

1.- En el modelo murino de malaria cerebral utilizado (ratones C57BL/6 infectados con *P. berghei* ANKA), la caracterización fenotípica del comportamiento de los animales permite establecer un protocolo de análisis del progreso clínico de la enfermedad definido en cuatro estadios en función de las manifestaciones neurológicas que aparecen. Este protocolo proporciona el marco experimental adecuado para una valoración fenotípica del daño asociado por la infección y reduce la variabilidad resultante de la heterogeneidad individual que hay en el progreso de la enfermedad.

2.- La disminución en la transcripción de marcadores neuronales implicados en sinaptogénesis, plasticidad sináptica y supervivencia neuronal, como el factor neurotrófico derivado del cerebro y la molécula de adhesión neural, está asociada al desarrollo progresivo de los síntomas neurológicos característicos de la malaria cerebral. Este hallazgo indica que los procesos fisiopatológicos en los que dichos factores están implicados juegan un papel clave en la neuroprotección del SNC frente al daño neurocognitivo que aparece durante esta patología.

3.- La derivatización de proteínas con DNPH antes de su generación mediante electroforesis bidimensional es la aproximación metodológica más adecuada para analizar la oxidación proteica en tejidos de cerebro debido a que el número de proteínas modificadas detectadas en el gel es mayor, a su menor fondo y a una mejor reproducibilidad.

4.- Los estudios de expresión génica de enzimas y factores de transcripción claves en el mantenimiento del estado redox del hospedador infectado ponen de manifiesto que el desarrollo de la malaria cerebral se ve acompañado de una disminución en los niveles transcripcionales de los genes que los codifican, lo que sugiere su implicación en las alteraciones neurológicas y posibles disfunciones cognitivas en la malaria cerebral murina. Por otro lado, la inducción compensatoria de las enzimas hemo oxigenasa-1 y glutatión peroxidasa observada en esos mismos animales puede explicar que, ni las especies reactivas de oxígeno ni las proteínas oxidadas, se acumulen durante la malaria cerebral.

1.- In the murine model of cerebral malaria used (*P. berghei* ANKA in C57BL/6 mice), the phenotypical characterization of animal neurobehavior allows establishing a protocol for disease progression analysis in four stages according to the neurological outcome. This protocol provides an adequate experimental framework for the phenotypic assessment of the damage associated with the malaria infection to reduce variability due to individual heterogeneity in disease progress.

2.- Decreasing in transcriptional levels of neural markers involved in synaptogenesis, synaptic plasticity and neuronal survival, such as brain-derived neurotrophic factor and neural cell adhesion molecule, is associated with the progressive development of the neurological symptoms of cerebral malaria. This finding suggests that physiopatological processes in which these factors are involved play a key role in SNC neuroprotection against neurocognitive damage produced in this pathology.

3.- Protein DNPH-derivatization before bidimensional electrophoresis is the methodological approach of choice to analyze protein oxidation in brain tissues due to the larger number of modified proteins detected in gels, its lower stained background and improved reproducibility.

4.- The analyses of expression of the enzymes and transcription factors involved in preserving the redox status of the infected host highlight that cerebral malaria progression is associated with a transcriptional downregulation of the corresponding encoded genes. These results suggest their implication in neurological alterations and potential cognitive damage during murine cerebral malaria. On the other hand, compensatory induction of heme oxygenase-1 and glutathione peroxidase could explain the absence of reactive oxygen species accumulation or protein oxidation build up during cerebral malaria.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ABBOTT, N. J., RONNBACK, L. and HANSSON, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 41-53.
- ADAM, E., PIERROT, C., LAFITTE, S., GODIN, C., SAOUDI, A., CAPRON, M. and KHALIFE, J. (2003). The age-related resistance of rats to *Plasmodium berghei* infection is associated with differential cellular and humoral immune responses. *Int J Parasitol*, **33**, 1067-1078.
- AHARONI, R., EILAM, R., DOMEV, H., LABUNSKAY, G., SELA, M. and ARNON, R. (2005). The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 19045-19050.
- AIKAWA, M. (1988). Human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*, **39**, 3-10.
- AISA, B., GIL-BEA, F. J., SOLAS, M., GARCIA-ALLOZA, M., CHEN, C. P., LAI, M. K., FRANCIS, P. T. and RAMIREZ, M. J. (2010). Altered NCAM expression associated with the cholinergic system in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **20**, 659-668.
- ALBRECHT, S. and BUERGER, E. (2009). Potential neuroprotection mechanisms in PD: focus on dopamine agonist pramipexole. *Curr Med Res Opin*, **25**, 2977-2987.
- ALEY, S. B., SHERWOOD, J. A. and HOWARD, R. J. (1984). Knob-positive and knob-negative *Plasmodium falciparum* differ in expression of a strain-specific malarial antigen on the surface of infected erythrocytes. *J Exp Med*, **160**, 1585-1590.
- ALLEN, R. G. and TRESINI, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*, **28**, 463-499.
- AMANTE, F. H., HAQUE, A., STANLEY, A. C., RIVERA FDE, L., RANDALL, L. M., WILSON, Y. A., YEO, G., PIEPER, C., CRABB, B. S., DE KONING-WARD, T. F., LUNDIE, R. J., GOOD, M. F., PINZON-CHARRY, A., PEARSON, M. S., DUKE, M. G., MCMANUS, D. P., LOUKAS, A., HILL, G. R. and ENGWERDA, C. R. (2010). Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. *J Immunol*, **185**, 3632-3642.
- AMANTE, F. H., STANLEY, A. C., RANDALL, L. M., ZHOU, Y., HAQUE, A., MCSWEENEY, K., WATERS, A. P., JANSE, C. J., GOOD, M. F., HILL, G. R. and ENGWERDA, C. R. (2007). A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol*, **171**, 548-559.
- ANAND, R., SEIBERLING, M., KAMTCHOUA, T. and POKORNY, R. (2007). Tolerability, safety and pharmacokinetics of the FGLL peptide, a novel mimetic of neural cell adhesion molecule, following intranasal administration in healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet*, **46**, 351-358.
- ARMAH, H., WIRED, E. K., DODOO, A. K., ADJEL, A. A., TETTEY, Y. and GYASI, R. (2005). Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. *Int J Environ Res Public Health*, **2**, 123-131.
- ARMAH, H. B., WILSON, N. O., SARFO, B. Y., POWELL, M. D., BOND, V. C., ANDERSON, W., ADJEL, A. A., GYASI, R. K., TETTEY, Y., WIREDU, E. K., TONGREN, J. E., UDHAYAKUMAR, V. and STILES, J. K. (2007). Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J*, **6**, 147.
- BAER, K., KLOTZ, C., KAPPE, S. H., SCHNIEDER, T. and FREVERT, U. (2007). Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog*, **3**, e171.
- BAGOT, S., IDRISSE BOUBOU, M., CAMPINO, S., BEHRSCHEMIDT, C., GORGETTE, O., GUENET, J. L., PENHA-GONCALVES, C., MAZIER, D., PIED, S. and CAZENAVE, P. A. (2002). Susceptibility

- to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. *Infect Immun*, **70**, 2049-2056.
- BAIRD, J. K. (2005). Effectiveness of antimalarial drugs. *N Engl J Med*, **352**, 1565-1577.
- BANGIRANA, P., IDRO, R., JOHN, C. C. and BOIVIN, M. J. (2006). Rehabilitation for cognitive impairments after cerebral malaria in African children: strategies and limitations. *Trop Med Int Health*, **11**, 1341-1349.
- BAPTISTA, F. G., PAMPLONA, A., PENA, A. C., MOTA, M. M., PIED, S. and VIGARIO, A. M. (2010). Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect Immun*, **78**, 4033-4039.
- BARTOSZ, G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol*, **77**, 1303-1315.
- BATELLI, S., ALBANI, D., RAMETTA, R., POLITO, L., PRATO, F., PESARESI, M., NEGRO, A. and FORLONI, G. (2008). DJ-1 modulates alpha-synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson's disease and involvement of HSP70. *PLoS ONE*, **3**, e1884.
- BEATTIE, E. C., STELLWAGEN, D., MORISHITA, W., BRESNAHAN, J. C., HA, B. K., VON ZASTROW, M., BEATTIE, M. S. and MALENKA, R. C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science*, **295**, 2282-2285.
- BECKER, K., TILLEY, L., VENNERSTROM, J. L., ROBERTS, D., ROGERSON, S. and GINSBURG, H. (2004). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol*, **34**, 163-189.
- BELL, D., WONGSRICHANALAI, C. and BARNWELL, J. W. (2006). Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? *Nat Rev Microbiol*, **4**, S7-20.
- BENTIVOGLIO, M., MARIOTTI, R. and BERTINI, G. (2010). Neuroinflammation and brain infections: Historical context and current perspectives. *Brain Res Rev*, **66**, 152-173.
- BINGOL, B. and SHENG, M. (2011). Deconstruction for reconstruction: the role of proteolysis in neural plasticity and disease. *Neuron*, **69**, 22-32.
- BISAZ, R., CONBOY, L. and SANDI, C. (2009). Learning under stress: a role for the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neurobiol Learn Mem*, **91**, 333-342.
- BOIVIN, M. J., BANGIRANA, P., BYARUGABA, J., OPOKA, R. O., IDRO, R., JUREK, A. M. and JOHN, C. C. (2007). Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics*, **119**, e360-366.
- BREMAN, J. G., ALILIO, M. S. and MILLS, A. (2004). Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am J Trop Med Hyg*, **71**, 1-15.
- BRIAN DE SOUZA, J., HAFALLA, J. C., RILEY, E. M. and COUPER, K. N. (2009). Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology*, **137**, 755-772.
- BROWN-BORG, H. M. and RAKOCZY, S. G. (2000). Catalase expression in delayed and premature aging mouse models. *Exp Gerontol*, **35**, 199-212.
- BROWN, H., ROGERSON, S., TAYLOR, T., TEMBO, M., MWENECHANYA, J., MOLYNEUX, M. and TURNER, G. (2001). Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. *Am J Trop Med Hyg*, **64**, 207-213.

- BRUNEEL, F., GACHOT, B., WOLFF, M., BEDOS, J. P., REGNIER, B., DANIS, M. and VACHON, F. (2002). [Blackwater fever]. *Presse Med*, **31**, 1329-1334.
- BUFFET, P. A., SAFEUKUI, I., DEPLAINE, G., BROUSSE, V., PRENDKI, V., THELLIER, M., TURNER, G. D. and MERCEREAU-PUJALON, O. (2010). The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*, **117**, 381-392.
- BUFFINTON, G. D., HUNT, N. H., COWDEN, W. B. and CLARK, I. A. (1988). Detection of short-chain carbonyl products of lipid peroxidation from malaria-parasite (*Plasmodium vinckei*)-infected red blood cells exposed to oxidative stress. *Biochem J*, **249**, 63-68.
- BUTTERFIELD, D. A., ABDUL, H. M., NEWMAN, S. and REED, T. (2006). Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. *NeuroRx*, **3**, 344-357.
- BUTTERFIELD, D. A., REED, T., NEWMAN, S. F. and SULTANA, R. (2007). Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med*, **43**, 658-677.
- CABRALES, P., ZANINI, G. M., MEAYS, D., FRANGOS, J. A. and CARVALHO, L. J. (2010). Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction, and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *Am J Pathol*, **176**, 1306-1315.
- CALABRESE, V., GUAGLIANO, E., SAPIENZA, M., PANEBIANCO, M., CALAFATO, S., PULEO, E., PENNISI, G., MANCUSO, C., BUTTERFIELD, D. A. and STELLA, A. G. (2007). Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochem Res*, **32**, 757-773.
- CARLSON, J., HELMBY, H., HILL, A. V., BREWSTER, D., GREENWOOD, B. M. and WAHLGREN, M. (1990). Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet*, **336**, 1457-1460.
- CARROLL, R. W., WAINWRIGHT, M. S., KIM, K. Y., KIDAMBI, T., GOMEZ, N. D., TAYLOR, T. and HALDAR, K. (2010). A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS ONE*, **5**, e13124.
- CARTER, J. A., MUNG'ALA-ODERA, V., NEVILLE, B. G., MURIRA, G., MTURI, N., MUSUMBA, C. and NEWTON, C. R. (2005). Persistent neurocognitive impairments associated with severe *falciparum* malaria in Kenyan children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **76**, 476-481.
- CARVALHO, L. J. (2010). Murine cerebral malaria: how far from human cerebral malaria? *Trends Parasitol*, **26**, 271-272.
- CASTEGNA, A., AKSENOV, M., AKSENOVA, M., THONGBOONKERD, V., KLEIN, J. B., PIERCE, W. M., BOOZE, R., MARKESBERY, W. R. and BUTTERFIELD, D. A. (2002). Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med*, **33**, 562-571.
- CECARINI, V., GEE, J., FIORETTI, E., AMICI, M., ANGELETTI, M., ELEUTERI, A. M. and KELLER, J. N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 93-104.
- CISNEROS, E., PUPO, J. and CÉSPEDES, E. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutathion peroxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed*, **16**, 10-15.

- CLARK, I. A., BUDD, A. C., ALLEVA, L. M. and COWDEN, W. B. (2006). Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J*, **5**, 85.
- CLARK, I. A., GRAY, K. M., ROCKETT, E. J., COWDEN, W. B., ROCKETT, K. A., FERRANTE, A. and AGGARWAL, B. B. (1992a). Increased lymphotoxin in human malarial serum, and the ability of this cytokine to increase plasma interleukin-6 and cause hypoglycaemia in mice: implications for malarial pathology. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **86**, 602-607.
- CLARK, I. A., ROCKETT, K. A. and COWDEN, W. B. (1992b). Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. *Lancet*, **340**, 894-896.
- COLLINS, A. R., LYON, C. J., XIA, X., LIU, J. Z., TANGIRALA, R. K., YIN, F., BOYADJIAN, R., BIKINEYEVA, A., PRATICO, D., HARRISON, D. G. and HSUEH, W. A. (2009). Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res*, **104**, e42-54.
- COMBES, V., COLTEL, N., FAILLE, D., WASSMER, S. C. and GRAU, G. E. (2006). Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol*, **36**, 541-546.
- COMBES, V., DE SOUZA, J. B., RÉNIA, L., HUNT, N. H. and GRAU, G. E. (2005). Cerebral malaria: Which parasite? Which model? *Drug Discov Today*, **2**, 141-147.
- COMBES, V., EL-ASSAAD, F., FAILLE, D., JAMBOU, R., HUNT, N. H. and GRAU, G. E. (2010). Microvesiculation and cell interactions at the brain-endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. *Prog Neurobiol*, **91**, 140-151.
- CONRAD, C. C., TALENT, J. M., MALAKOWSKY, C. A. and GRACY, R. W. (2000). Post-Electrophoretic Identification of Oxidized Proteins. *Biol Proced Online*, **2**, 39-45.
- CORONA, C., MASCIOPINTO, F., SILVESTRI, E., VISCOVO, A. D., LATTANZIO, R., SORDA, R. L., CIAVARDELLI, D., GOGLIA, F., PIANTELLI, M., CANZONIERO, L. M. and SENSI, S. L. (2010). Dietary zinc supplementation of 3xTg-AD mice increases BDNF levels and prevents cognitive deficits as well as mitochondrial dysfunction. *Cell Death Dis*, **1**, e91.
- CRAIG, A. G., PINCHES, R., KHAN, S., ROBERTS, D. J., TURNER, G. D., NEWBOLD, C. I. and BERENDT, A. R. (1997). Failure to block adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to ICAM-1 with soluble ICAM-1. *Infect Immun*, **65**, 4580-4585.
- CROMPTON, P. D., PIERCE, S. K. and MILLER, L. H. (2011). Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest*, **120**, 4168-4178.
- CUNHA, C., BRAMBILLA, R. and THOMAS, K. L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*, **3**, 1.
- CHAKRAVORTY, S. J., HUGHES, K. R. and CRAIG, A. G. (2008). Host response to cytoadherence in Plasmodium falciparum. *Biochem Soc Trans*, **36**, 221-228.
- CHEN, L., CAGNIARD, B., MATHEWS, T., JONES, S., KOH, H. C., DING, Y., CARVEY, P. M., LING, Z., KANG, U. J. and ZHUANG, X. (2005). Age-dependent motor deficits and dopaminergic dysfunction in DJ-1 null mice. *J Biol Chem*, **280**, 21418-21426.
- CHEN, Q., BARRAGAN, A., FERNANDEZ, V., SUNDSTROM, A., SCHLICHTHERLE, M., SAHLEN, A., CARLSON, J., DATTA, S. and WAHLGREN, M. (1998). Identification of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite P. falciparum. *J Exp Med*, **187**, 15-23.

- CHEN, Q., SCHLICHOTHERLE, M. and WAHLGREN, M. (2000). Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev*, **13**, 439-450.
- CHIU, C. T. and CHUANG, D. M. (2010). Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders. *Pharmacol Ther*, **128**, 281-304.
- CHOI, S., PARK, K. A., LEE, H. J., PARK, M. S., LEE, J. H., PARK, K. C., KIM, M., LEE, S. H., SEO, J. S. and YOON, B. W. (2005). Expression of Cu/Zn SOD protein is suppressed in hsp 70.1 knockout mice. *J Biochem Mol Biol*, **38**, 111-114.
- DAILY, J. P. and WALDRON, M. A. (2003). Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 22-2003. A 22-year-old man with chills and fever after a stay in South America. *N Engl J Med*, **349**, 287-295.
- DALLE-DONNE, I., ALDINI, G., CARINI, M., COLOMBO, R., ROSSI, R. and MILZANI, A. (2006a). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*, **10**, 389-406.
- DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., COLOMBO, R., GIUSTARINI, D. and MILZANI, A. (2006b). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*, **52**, 601-623.
- DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A. and COLOMBO, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, **329**, 23-38.
- DE SOUZA, J. B. and RILEY, E. M. (2002). Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect*, **4**, 291-300.
- DELAHAYE, N. F., COLTEL, N., PUTHIER, D., BARBIER, M., BENECH, P., JOLY, F., IRAQI, F. A., GRAU, G. E., NGUYEN, C. and RIHET, P. (2007). Gene expression analysis reveals early changes in several molecular pathways in cerebral malaria-susceptible mice versus cerebral malaria-resistant mice. *BMC Genomics*, **8**, 452.
- DESRUISSEAUX, M. S., IACOBAS, D. A., IACOBAS, S., MUKHERJEE, S., WEISS, L. M., TANOWITZ, H. B. and SPRAY, D. C. (2010). Alterations in the brain transcriptome in *Plasmodium berghei* ANKA infected mice. *Journal of Neuroparasitology*, **1**, 1-8.
- DI FILIPPO, M., SARCHIELLI, P., PICCONI, B. and CALABRESI, P. (2008). Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. *Trends Pharmacol Sci*, **29**, 402-412.
- DONG, C., UPADHYA, S. C., DING, L., SMITH, T. K. and HEGDE, A. N. (2008). Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. *Learn Mem*, **15**, 335-347.
- DONOVAN, M. J., LIN, M. I., WIEGN, P., RINGSTEDT, T., KRAEMER, R., HAHN, R., WANG, S., IBANEZ, C. F., RAFII, S. and HEMPSTEAD, B. L. (2000). Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*, **127**, 4531-4540.
- DRINGEN, R., PAWLOWSKI, P. G. and HIRRLINGER, J. (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res*, **79**, 157-165.
- DROGE, W. and SCHIPPER, H. M. (2007). Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell*, **6**, 361-370.
- DUAN, W., PENG, Q., MASUDA, N., FORD, E., TRYGGESTAD, E., LADENHEIM, B., ZHAO, M., CADET, J. L., WONG, J. and ROSS, C. A. (2008). Sertraline slows disease progression and

- increases neurogenesis in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, **30**, 312-322.
- DUMONT, M., WILLE, E., STACK, C., CALINGASAN, N. Y., BEAL, M. F. and LIN, M. T. (2009). Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*, **23**, 2459-2466.
- EBADI, M., BASHIR, R. M., HEIDRICK, M. L., HAMADA, F. M., REFAEY, H. E., HAMED, A., HELAL, G., BAXI, M. D., CERUTIS, D. R. and LASSI, N. K. (1997). Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int*, **30**, 347-374.
- ENAYATI, A. and HEMINGWAY, J. (2010). Malaria management: past, present, and future. *Annu Rev Entomol*, **55**, 569-591.
- ENGWERDA, C. R., MYNOTT, T. L., SAWHNEY, S., DE SOUZA, J. B., BICKLE, Q. D. and KAYE, P. M. (2002). Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med*, **195**, 1371-1377.
- ENSTROM, A., ONORE, C., TARVER, A., HERTZ-PICCIOTTO, I., HANSEN, R., CROEN, L., VAN DE WATER, J. and ASHWOOD, P. (2008). Peripheral blood leukocyte production of BDNF following mitogen stimulation in early onset and regressive autism. *Am. J. Biochem. & Biotech.*, **4**, 121-129.
- FERNANDEZ-REYES, D., CRAIG, A. G., KYES, S. A., PESHU, N., SNOW, R. W., BERENDT, A. R., MARSH, K. and NEWBOLD, C. I. (1997). A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet*, **6**, 1357-1360.
- FERNANDEZ, V., TREUTIGER, C. J., NASH, G. B. and WAHLGREN, M. (1998). Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting binding of erythrocytes in Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun*, **66**, 2969-2975.
- FERREIRA, A., BALLA, J., JENEY, V., BALLA, G. and SOARES, M. P. (2008). A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med*, **86**, 1097-1111.
- FERREIRA, A., MARGUTI, I., BECHMANN, I., JENEY, V., CHORA, A., PALHA, N. R., REBELO, S., HENRI, A., BEUZARD, Y. and SOARES, M. P. (2011). Sick hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell*, **145**, 398-409.
- FERRER, I., MARTIN, B., CASTANO, J. G., LUCAS, J. J., MORENO, D. and OLIVE, M. (2004). Proteasomal expression, induction of immunoproteasome subunits, and local MHC class I presentation in myofibrillar myopathy and inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol*, **63**, 484-498.
- FIGTREE, M., LEE, R., BAIN, L., KENNEDY, T., MACKERTICH, S., URBAN, M., CHENG, Q. and HUDSON, B. J. (2010). Plasmodium knowlesi in human, Indonesian Borneo. *Emerg Infect Dis*, **16**, 672-674.
- FRANCIS, K., VAN BEEK, J., CANOVA, C., NEAL, J. W. and GASQUE, P. (2003). Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. *Expert Rev Mol Med*, **5**, 1-19.
- FRANKE-FAYARD, B., FONAGER, J., BRAKS, A., KHAN, S. M. and JANSE, C. J. (2010). Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathog*, **6**, e1001032.

- FRANKE-FAYARD, B., JANSE, C. J., CUNHA-RODRIGUES, M., RAMESAR, J., BUSCHER, P., QUE, I., LOWIK, C., VOSHOL, P. J., DEN BOER, M. A., VAN DUINEN, S. G., FEBBRAIO, M., MOTA, M. M. and WATERS, A. P. (2005). Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11468-11473.
- FREVERT, U. and NARDIN, E. (2005). Arrest in the liver--a genetically defined malaria vaccine? *N Engl J Med*, **352**, 1600-1602.
- FROSCH, T., KONCAREVIC, S., ZEDLER, L., SCHMITT, M., SCHENZEL, K., BECKER, K. and POPP, J. (2007). In situ localization and structural analysis of the malaria pigment hemozoin. *J Phys Chem B*, **111**, 11047-11056.
- FUJIOKA, H. and AIKAWA, M. (1996). The molecular basis of pathogenesis of cerebral malaria. *Microb Pathog*, **20**, 63-72.
- FUKAMI, E., NAKAYAMA, A., SASAKI, J., MIMURA, S., MORI, N. and WATANABE, K. (2000). Underexpression of neural cell adhesion molecule and neurotrophic factors in rat brain following thromboxane A(2)-induced intrauterine growth retardation. *Early Hum Dev*, **58**, 101-110.
- FUMAGALLI, F., RACAGNI, G. and RIVA, M. A. (2006a). The expanding role of BDNF: a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Pharmacogenomics J*, **6**, 8-15.
- FUMAGALLI, F., RACAGNI, G. and RIVA, M. A. (2006b). Shedding light into the role of BDNF in the pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Pharmacogenomics J*, **6**, 95-104.
- GASPAR, T., DOMOKI, F., LENTI, L., INSTITTORIS, A., SNIPES, J. A., BARI, F. and BUSIJA, D. W. (2009). Neuroprotective effect of adenoviral catalase gene transfer in cortical neuronal cultures. *Brain Res*, **1270**, 1-9.
- GAVILAN, M. P., CASTANO, A., TORRES, M., PORTAVELLA, M., CABALLERO, C., JIMENEZ, S., GARCIA-MARTINEZ, A., PARRADO, J., VITORICA, J. and RUANO, D. (2009). Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects. *J Neurochem*, **108**, 260-272.
- GIFFARD, R. G., HAN, R. Q., EMERY, J. F., DUAN, M. and PITTET, J. F. (2008). Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70. *Anesthesiology*, **109**, 339-348.
- GILBERT, D. L. (1981). *Oxygen and Living Processes. An interdisciplinary Approach.*, Springer Verlag, New York.
- GINGRAS, M. C., ROUSSEL, E., BRUNER, J. M., BRANCH, C. D. and MOSER, R. P. (1995). Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J Neuroimmunol*, **57**, 143-153.
- GITAU, E. N. and NEWTON, C. R. (2005). Review Article: blood-brain barrier in falciparum malaria. *Trop Med Int Health*, **10**, 285-292.
- GLIMCHER, L. H. (2010). XBP1: the last two decades. *Ann Rheum Dis*, **69 Suppl 1**, i67-71.
- GOLDBERG, M. S., PISANI, A., HABURCAK, M., VORTHERMS, T. A., KITADA, T., COSTA, C., TONG, Y., MARTELLA, G., TSCHERTER, A., MARTINS, A., BERNARDI, G., ROTH, B. L., POTHOS, E. N., CALABRESI, P. and SHEN, J. (2005). Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron*, **45**, 489-496.

- GOOD, M. F., XU, H., WYKES, M. and ENGWERDA, C. R. (2005). Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol*, **23**, 69-99.
- GORDON, T. (2009). The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus*, **26**, E3.
- GREENBERG, M. E., XU, B., LU, B. and HEMPSTEAD, B. L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci*, **29**, 12764-12767.
- GREENWOOD, B. M., BOJANG, K., WHITTY, C. J. and TARGETT, G. A. (2005). Malaria. *Lancet*, **365**, 1487-1498.
- GREENWOOD, B. M., FIDOCK, D. A., KYLE, D. E., KAPPE, S. H., ALONSO, P. L., COLLINS, F. H. and DUFFY, P. E. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*, **118**, 1266-1276.
- GROETTRUP, M., KIRK, C. J. and BASLER, M. (2010). Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol*, **10**, 73-78.
- GROTE, C. L., PIERRE-LOUIS, S. J. and DURWARD, W. F. (1997). Deficits in delayed memory following cerebral malaria: a case study. *Cortex*, **33**, 385-388.
- GUPTA, S., DEEPTI, A., DEEGAN, S., LISBONA, F., HETZ, C. and SAMALI, A. (2010). HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1alpha-XBP1 signaling through a physical interaction. *PLoS Biol*, **8**, e1000410.
- GUYTON, A. C. (1994). *Anatomía y fisiología del sistema nervioso. Neurociencia básica*, 2ª edn. Editorial médica panamericana, Madrid.
- HANDUNNETTI, S. M., VAN SCHRAVENDIJK, M. R., HASLER, T., BARNWELL, J. W., GREENWALT, D. E. and HOWARD, R. J. (1992). Involvement of CD36 on erythrocytes as a rosetting receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Blood*, **80**, 2097-2104.
- HANSEN, D. S. and SCHOFIELD, L. (2010). Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? *PLoS Pathog*, **6**, e1000771.
- HAUSMANN, K., N. HÜLSMANN, AND R. RADEK (2003). *Protistology*, 3rd edn. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart.
- HAY, S. I., D. J. ROGERS, J. F. TOOMER, AND R. W. SNOW (2004). Annual Plasmodium falciparum Entomological Inoculation Rates (EIR) across Africa: Literature Survey, Internet Access, and Review *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**, 113-127.
- HEARN, J., RAYMENT, N., LANDON, D. N., KATZ, D. R. and DE SOUZA, J. B. (2000). Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun*, **68**, 5364-5376.
- HENSLEY, K., ROBINSON, K. A., GABBITA, S. P., SALSMAN, S. and FLOYD, R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, **28**, 1456-1462.
- HO, M., SCHOLLAARDT, T., NIU, X., LOOAREESUWAN, S., PATEL, K. D. and KUBES, P. (1998). Characterization of Plasmodium falciparum-infected erythrocyte and P-selectin interaction under flow conditions. *Blood*, **91**, 4803-4809.
- HO, M. and WHITE, N. J. (1999). Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol*, **276**, C1231-1242.
- HOFFMAN, S. L., SUBRAMANIAN, G. M., COLLINS, F. H. and VENTER, J. C. (2002). Plasmodium, human and Anopheles genomics and malaria. *Nature*, **415**, 702-709.

- HOLDING, P. A. and SNOW, R. W. (2001). Impact of *Plasmodium falciparum* malaria on performance and learning: review of the evidence. *Am J Trop Med Hyg*, **64**, 68-75.
- HU, D., SERRANO, F., OURY, T. D. and KLANN, E. (2006). Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J Neurosci*, **26**, 3933-3941.
- HUANG, C. Y., FUJIMURA, M., NOSHITA, N., CHANG, Y. Y. and CHAN, P. H. (2001). SOD1 down-regulates NF-kappaB and c-Myc expression in mice after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, **21**, 163-173.
- HUNT, N. H., GOLENSER, J., CHAN-LING, T., PAREKH, S., RAE, C., POTTER, S., MEDANA, I. M., MIU, J. and BALL, H. J. (2006). Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol*, **36**, 569-582.
- HUNT, N. H. and GRAU, G. E. (2003). Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol*, **24**, 491-499.
- HUNT, N. H., GRAU, G. E., ENGWERDA, C., BARNUM, S. R., VAN DER HEYDE, H., HANSEN, D. S., SCHOFIELD, L. and GOLENSER, J. (2010). Murine cerebral malaria: the whole story. *Trends Parasitol*, **26**, 272-274.
- HUNT, N. H. and STOCKER, R. (2007). Heme moves to center stage in cerebral malaria. *Nat Med*, **13**, 667-669.
- HUSSAIN, S., RODGERS, D. A., DUHART, H. M. and ALI, S. F. (1997). Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. *J Environ Sci Health B*, **32**, 395-409.
- IDRO, R., JENKINS, N. E. and NEWTON, C. R. (2005). Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol*, **4**, 827-840.
- IDRO, R., KAKOOZA-MWESIGE, A., BALLYEJJUSSA, S., MIREMBE, G., MUGASHA, C., TUGUMISIRIZE, J. and BYARUGABA, J. (2010a). Severe neurological sequelae and behaviour problems after cerebral malaria in Ugandan children. *BMC Res Notes*, **3**, 104.
- IDRO, R., MARSH, K., JOHN, C. C. and NEWTON, C. R. (2010b). Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatr Res*, **68**, 267-274.
- JAMISON, D. T., J. G. BREMAN, A. R. MEASHAM, G. ALLEYNE, M. CLAESON, D. B. EVANS, P. JHA, A. MILLS, AND P. MUSGROVE (2006). *Disease Control Priorities in Developing Countries*, The World Bank and Oxford University Press, Washington.
- JENNINGS, V. M., ACTOR, J. K., LAL, A. A. and HUNTER, R. L. (1997). Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. *Infect Immun*, **65**, 4883-4887.
- JOHN, C. C., BANGIRANA, P., BYARUGABA, J., OPOKA, R. O., IDRO, R., JUREK, A. M., WU, B. and BOIVIN, M. J. (2008). Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics*, **122**, e92-99.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H. and JESSEL, T. M. (2001). *Principios de Neurociencia*, 4ª edn. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid.
- KISS, J. Z., TRONCOSO, E., DJEBBARA, Z., VUTSKITS, L. and MULLER, D. (2001). The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Res Brain Res Rev*, **36**, 175-184.
- KLEMENTIEV, B., NOVIKOVA, T., NOVITSKAYA, V., WALMOD, P. S., DMYTRIYEVA, O., PAKKENBERG, B., BEREZIN, V. and BOCK, E. (2007). A neural cell adhesion molecule-derived

- peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Abeta25-35. *Neuroscience*, **145**, 209-224.
- KLOETZEL, P. M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol*, **5**, 661-669.
- KONSTANTINOVA, I. M., TSIMOKHA, A. S. and MITTENBERG, A. G. (2008). Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol*, **267**, 59-124.
- KOROLAINEN, M. A., GOLDSTEINS, G., NYMAN, T. A., ALAFUZOFF, I., KOISTINAHO, J. and PIRTILA, T. (2006). Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging*, **27**, 42-53.
- KUMAR, S., GUHA, M., CHOUBEY, V., MAITY, P., SRIVASTAVA, K., PURI, S. K. and BANDYOPADHYAY, U. (2008). Bilirubin inhibits Plasmodium falciparum growth through the generation of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, **44**, 602-613.
- KWAK, M. K., WAKABAYASHI, N., GREENLAW, J. L., YAMAMOTO, M. and KENSLER, T. W. (2003). Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol*, **23**, 8786-8794.
- KWIATKOWSKI, D., MOLYNEUX, M. E., STEPHENS, S., CURTIS, N., KLEIN, N., POINTAIRE, P., SMIT, M., ALLAN, R., BREWSTER, D. R., GRAU, G. E. and ET AL. (1993). Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Q J Med*, **86**, 91-98.
- LACERDA-QUEIROZ, N., RODRIGUES, D. H., VILELA, M. C., MIRANDA, A. S., AMARAL, D. C., CAMARGOS, E. R., CARVALHO, L. J., HOWE, C. L., TEIXEIRA, M. M. and TEIXEIRA, A. L. (2010). Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in Plasmodium berghei (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol*, **125**, 271-278.
- LACKNER, P., BEER, R., HEUSSLER, V., GOEBEL, G., RUDZKI, D., HELBOK, R., TANNICH, E. and SCHMUTZHARD, E. (2006). Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **32**, 177-188.
- LACKNER, P., PART, A., BURGER, C., DIETMANN, A., BROESSNER, G., HELBOK, R., REINDL, M., SCHMUTZHARD, E. and BEER, R. (2009). Glatiramer acetate reduces the risk for experimental cerebral malaria: a pilot study. *Malar J*, **8**, 36.
- LE, W. D. and JANKOVIC, J. (2001). Are dopamine receptor agonists neuroprotective in Parkinson's disease? *Drugs Aging*, **18**, 389-396.
- LESSMANN, V. and BRIGADSKI, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res*, **65**, 11-22.
- LEVIN, E. D. (2005). Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) quenches free radicals and attenuates age-related cognitive decline: opportunities for novel drug development in aging. *Curr Alzheimer Res*, **2**, 191-196.
- LEVINE, R. L., WILLIAMS, J. A., STADTMAN, E. R. and SHACTER, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, **233**, 346-357.
- LEWITUS, G. M., COHEN, H. and SCHWARTZ, M. (2008). Reducing post-traumatic anxiety by immunization. *Brain Behav Immun*, **22**, 1108-1114.
- LISAK, R. P., BENJAMINS, J. A., BEALMEAR, B., NEDELKOSKA, L., YAO, B., LAND, S. and STUDZINSKI, D. (2007). Differential effects of Th1, monocyte/macrophage and Th2 cytokine mixtures on early gene expression for glial and neural-related molecules in central nervous

- system mixed glial cell cultures: neurotrophins, growth factors and structural proteins. *J Neuroinflammation*, **4**, 30.
- LIU, Y., ADACHI, M., ZHAO, S., HAREYAMA, M., KOONG, A. C., LUO, D., RANDO, T. A., IMAI, K. and SHINOMURA, Y. (2009). Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death Differ*, **16**, 847-857.
- LÓPEZ-VÉLEZ, R. (2002). *Malaria y viajes internacionales*, Marco Gráfico S.L., Madrid.
- LOU, J., LUCAS, R. and GRAU, G. E. (2001). Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 810-820, table of contents.
- LOVEGROVE, F. E., PENA-CASTILLO, L., MOHAMMAD, N., LILES, W. C., HUGHES, T. R. and KAIN, K. C. (2006). Simultaneous host and parasite expression profiling identifies tissue-specific transcriptional programs associated with susceptibility or resistance to experimental cerebral malaria. *BMC Genomics*, **7**, 295.
- LU, B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem*, **10**, 86-98.
- LUSE, S. A. and MILLER, L. H. (1971). Plasmodium falciparum malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am J Trop Med Hyg*, **20**, 655-660.
- MA, Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther*, **125**, 376-393.
- MACKINTOSH, C. L., BEESON, J. G. and MARSH, K. (2004). Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol*, **20**, 597-603.
- MACPHERSON, G. G., WARRELL, M. J., WHITE, N. J., LOOAREESUWAN, S. and WARRELL, D. A. (1985). Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol*, **119**, 385-401.
- MADRI, J. A. (2009). Modeling the neurovascular niche: implications for recovery from CNS injury. *J Physiol Pharmacol*, **60 Suppl 4**, 95-104.
- MAEGRAITH, B. (1948). *Pathological Processes in Malaria and Blackwater Fever*, Blackwell.
- MAIER, C. M. and CHAN, P. H. (2002). Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist*, **8**, 323-334.
- MARCUS, D. L., THOMAS, C., RODRIGUEZ, C., SIMBERKOFF, K., TSAI, J. S., STRAFACI, J. A. and FREEDMAN, M. L. (1998). Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, **150**, 40-44.
- MARCHIAFAVA, E. and BIGNAMI, A. (1894). *Sulle Febbre Malariche Estivo-Autunnali*, E. Loescher, Rome.
- MARCHIAFAVA, E. and CELLI, A. (1887). Sull'infezione malarica. *Bollettino Regia Accademia Medica di Roma*, **18**.
- MARIN-GARCIA, P., SANCHEZ-NOGUEIRO, J., DIEZ, A., LEON-OTEGUI, M., LINARES, M., GARCIA-PALENCIA, P., BAUTISTA, J. M. and MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2009). Altered nucleotide receptor expression in a murine model of cerebral malaria. *J Infect Dis*, **200**, 1279-1288.
- MATES, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, **153**, 83-104.
- MCCORMICK, C. J., CRAIG, A., ROBERTS, D., NEWBOLD, C. I. and BERENDT, A. R. (1997). Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of Plasmodium

- falciparum-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells. *J Clin Invest*, **100**, 2521-2529.
- MEDANA, I. M. and ESIRI, M. M. (2003). Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain*, **126**, 515-530.
- MEDANA, I. M., IDRO, R. and NEWTON, C. R. (2007). Axonal and astrocyte injury markers in the cerebrospinal fluid of Kenyan children with severe malaria. *J Neurol Sci*, **258**, 93-98.
- MEDANA, I. M., MAI, N. T., DAY, N. P., HIEN, T. T., BETHELL, D., PHU, N. H., FARRAR, J., WHITE, N. J. and TURNER, G. D. (2001). Cellular stress and injury responses in the brains of adult Vietnamese patients with fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **27**, 421-433.
- MEDANA, I. M. and TURNER, G. D. (2006). Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol*, **36**, 555-568.
- MEDANA, I. M. and TURNER, G. D. (2007). *Plasmodium falciparum* and the blood-brain barrier--contacts and consequences. *J Infect Dis*, **195**, 921-923.
- MENDEZ, D., LINARES, M., DIEZ, A., PUYET, A. and BAUTISTA, J. M. (2011). Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon *Plasmodium falciparum* invasion are differentially carbonylated in G6PD A(-) deficiency. *Free Radic Biol Med*, **50**, 1305-1313.
- MILLER, L. H., BARUCH, D. I., MARSH, K. and DOUMBO, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, **415**, 673-679.
- MILLINGTON, O. R., GIBSON, V. B., RUSH, C. M., ZINSELMAYER, B. H., PHILLIPS, R. S., GARSIDE, P. and BREWER, J. M. (2007). Malaria impairs T cell clustering and immune priming despite normal signal 1 from dendritic cells. *PLoS Pathog*, **3**, 1380-1387.
- MISHRA, S. K. and NEWTON, C. R. (2009). Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malaria. *Nat Rev Neurol*, **5**, 189-198.
- MISHTO, M., BELLAVISTA, E., SANTORO, A., STOLZING, A., LIGORIO, C., NACMIAS, B., SPAZZAFUMO, L., CHIAPPELLI, M., LICASTRO, F., SORBI, S., PESSION, A., OHM, T., GRUNE, T. and FRANCESCHI, C. (2006). Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging*, **27**, 54-66.
- MIU, J., HUNT, N. H. and BALL, H. J. (2008). Predominance of interferon-related responses in the brain during murine malaria, as identified by microarray analysis. *Infect Immun*, **76**, 1812-1824.
- MOORE, D. J., ZHANG, L., TRONCOSO, J., LEE, M. K., HATTORI, N., MIZUNO, Y., DAWSON, T. M. and DAWSON, V. L. (2005). Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet*, **14**, 71-84.
- MULLER, D., DJEBBARA-HANNAS, Z., JOURDAIN, P., VUTSKITS, L., DURBEC, P., ROUGON, G. and KISS, J. Z. (2000). Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4315-4320.
- MULLER, S. (2004). Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, **53**, 1291-1305.

- MURPHY, J. A., FRANKLIN, T. B., RAFUSE, V. F. and CLARKE, D. B. (2007). The neural cell adhesion molecule is necessary for normal adult retinal ganglion cell number and survival. *Mol Cell Neurosci*, **36**, 280-292.
- NAGY, Z., SIMON, L. and BORI, Z. (2002). [Regulatory mechanisms in focal cerebral ischemia. New possibilities in neuroprotective therapy]. *Ideggyogy Sz*, **55**, 73-85.
- NEWBOLD, C., WARN, P., BLACK, G., BERENDT, A., CRAIG, A., SNOW, B., MSOBO, M., PESHU, N. and MARSH, K. (1997). Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, **57**, 389-398.
- NEWTON, C. R., HIEN, T. T. and WHITE, N. (2000). Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **69**, 433-441.
- NEWTON, C. R. and KRISHNA, S. (1998). Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther*, **79**, 1-53.
- NGUYEN, T. P., SOUKUP, V. M. and GELMAN, B. B. (2010). Persistent hijacking of brain proteasomes in HIV-associated dementia. *Am J Pathol*, **176**, 893-902.
- NOGUEIRA, F., DIEZ, A., RADFAR, A., PEREZ-BENAVENTE, S., DO ROSARIO, V. E., PUYET, A. and BAUTISTA, J. M. (2010). Early transcriptional response to chloroquine of the *Plasmodium falciparum* antioxidant defence in sensitive and resistant clones. *Acta Trop*, **114**, 109-115.
- NOSHITA, N., SUGAWARA, T., FUJIMURA, M., MORITA-FUJIMURA, Y. and CHAN, P. H. (2001). Manganese Superoxide Dismutase Affects Cytochrome c Release and Caspase-9 Activation After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, **21**, 557-567.
- OAKLEY, M. S., ANANTHARAMAN, V., VENANCIO, T. M., ZHENG, H., MAHAJAN, B., MAJAM, V., MCCUTCHAN, T. F., MYERS, T. G., ARAVIND, L. and KUMAR, S. (2010). Molecular correlates of experimental cerebral malaria detectable in whole blood. *Infect Immun*, **79**, 1244-1253.
- OAKLEY, M. S., MCCUTCHAN, T. F., ANANTHARAMAN, V., WARD, J. M., FAUCETTE, L., EREXSON, C., MAHAJAN, B., ZHENG, H., MAJAM, V., ARAVIND, L. and KUMAR, S. (2008). Host biomarkers and biological pathways that are associated with the expression of experimental cerebral malaria in mice. *Infect Immun*, **76**, 4518-4529.
- OAKS, S. C., V.S. MITCHELL, G.W. PEARSON, AND C.C.J. CARPENTER (1991). *Malaria. Obstacles and Opportunities*, National Academy Press, Washington.
- OCKENHOUSE, C. F., TEGOSHI, T., MAENO, Y., BENJAMIN, C., HO, M., KAN, K. E., THWAY, Y., WIN, K., AIKAWA, M. and LOBB, R. R. (1992). Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*, **176**, 1183-1189.
- OOKAWARA, T., IMAZEKI, N., MATSUBARA, O., KIZAKI, T., OH-ISHI, S., NAKAO, C., SATO, Y. and OHNO, H. (1998). Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol*, **275**, C840-847.
- OROZCO-IBARRA, M., CHIRINO, Y. I. and PEDRAZA-CHAVERRI, J. (2006). [Role of hemeoxygenase-1 in the neurodegenerative disorders]. *Rev Neurol*, **43**, 556-562.
- PAIN, A., FERGUSON, D. J., KAI, O., URBAN, B. C., LOWE, B., MARSH, K. and ROBERTS, D. J. (2001). Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1805-1810.

- PAMPLONA, A., FERREIRA, A., BALLA, J., JENEY, V., BALLA, G., EPIPHANIO, S., CHORA, A., RODRIGUES, C. D., GREGOIRE, I. P., CUNHA-RODRIGUES, M., PORTUGAL, S., SOARES, M. P. and MOTA, M. M. (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*, **13**, 703-710.
- PAREKH, S. B., BUBB, W. A., HUNT, N. H. and RAE, C. (2006). Brain metabolic markers reflect susceptibility status in cytokine gene knockout mice with murine cerebral malaria. *Int J Parasitol*, **36**, 1409-1418.
- PATANKAR, T. F., KARNAD, D. R., SHETTY, P. G., DESAI, A. P. and PRASAD, S. R. (2002). Adult cerebral malaria: prognostic importance of imaging findings and correlation with postmortem findings. *Radiology*, **224**, 811-816.
- PATENAUDE, A., MURTHY, M. R. and MIRALTO, M. E. (2005). Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 1063-1080.
- PENET, M. F., VIOLA, A., CONFORT-GOUNY, S., LE FUR, Y., DUHAMEL, G., KOBER, F., IBARROLA, D., IZQUIERDO, M., COLTEL, N., GHARIB, B., GRAU, G. E. and COZZONE, P. J. (2005). Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci*, **25**, 7352-7358.
- PIERROT, C., ADAM, E., LAFITTE, S., GODIN, C., DIVE, D., CAPRON, M. and KHALIFE, J. (2003). Age-related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats. *Exp Parasitol*, **104**, 81-85.
- PINO, P., TAOUFIQ, Z., NITCHEU, J., VOULDOUKIS, I. and MAZIER, D. (2005). Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost*, **94**, 336-340.
- PINO, P., VOULDOUKIS, I., DUGAS, N., HASSANI-LOPPION, G., DUGAS, B. and MAZIER, D. (2003a). Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci*, **1010**, 582-586.
- PINO, P., VOULDOUKIS, I., KOLB, J. P., MAHMOUDI, N., DESPORTES-LIVAGE, I., BRICAIRE, F., DANIS, M., DUGAS, B. and MAZIER, D. (2003b). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J Infect Dis*, **187**, 1283-1290.
- PONGPONRATN, E., TURNER, G. D., DAY, N. P., PHU, N. H., SIMPSON, J. A., STEPNIEWSKA, K., MAI, N. T., VIRIYAVEJAKUL, P., LOOAREESUWAN, S., HIEN, T. T., FERGUSON, D. J. and WHITE, N. J. (2003). An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, **69**, 345-359.
- POO, M. M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 24-32.
- POSTMA, N. S., MOMMERS, E. C., ELING, W. M. and ZUIDEMA, J. (1996). Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. *Pharm World Sci*, **18**, 121-129.
- POUVELLE, B., MATARAZZO, V., JURZYNSKI, C., NEMETH, J., RAMHARTER, M., ROUGON, G. and GYSIN, J. (2007). Neural cell adhesion molecule, a new cytoadhesion receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes capable of aggregation. *Infect Immun*, **75**, 3516-3522.
- PRUDENCIO, M., RODRIGUEZ, A. and MOTA, M. M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 849-856.
- PUENTE, S., T. GARCÍA-BENAYAS, G. SESEÑA, AND J.M. GONZÁLEZ-LAHOZ (2005). Malaria: conceptos clínicos y terapéuticos. *Enfermedades Emergentes*, **7**, 34-39.

- PURVES, D., AUGUSTINE, G. J., FITZPATRICK, D., KATZ, L. C., O MC NAMARA, J. and WILLIAMS, S. M. (2001). *Neuroscience*, Sinauer Associates, Sunderland (M.A.).
- RADFAR, A., DIEZ, A. and BAUTISTA, J. M. (2008). Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*. *Free Radic Biol Med*, **44**, 2034-2042.
- RAE, C., MCQUILLAN, J. A., PAREKH, S. B., BUBB, W. A., WEISER, S., BALCAR, V. J., HANSEN, A. M., BALL, H. J. and HUNT, N. H. (2004). Brain gene expression, metabolism, and bioenergetics: interrelationships in murine models of cerebral and noncerebral malaria. *Faseb J*, **18**, 499-510.
- RANDALL, D. W. B., AND K. FRENCH (1999). *Eckert. Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones*, McGraw-Hill Intramericana, Madrid.
- RANDALL, L. M. and ENGWERDA, C. R. (2010). TNF family members and malaria: old observations, new insights and future directions. *Exp Parasitol*, **126**, 326-331.
- RAO, A., KUMAR, M. K., JOSEPH, T. and BULUSU, G. (2010). Cerebral malaria: insights from host-parasite protein-protein interactions. *Malar J*, **9**, 155.
- REINHECKEL, T., KORN, S., MOHRING, S., AUGUSTIN, W., HALANGK, W. and SCHILD, L. (2000). Adaptation of protein carbonyl detection to the requirements of proteome analysis demonstrated for hypoxia/reoxygenation in isolated rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, **376**, 59-65.
- REIS, P. A., COMIM, C. M., HERMANI, F., SILVA, B., BARICHELLO, T., PORTELLA, A. C., GOMES, F. C., SAB, I. M., FRUTUOSO, V. S., OLIVEIRA, M. F., BOZZA, P. T., BOZZA, F. A., DAL-PIZZOL, F., ZIMMERMAN, G. A., QUEVEDO, J. and CASTRO-FARIA-NETO, H. C. (2010). Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *PLoS Pathog*, **6**, e1000963.
- REST, J. R. (1982). Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **76**, 410-415.
- RHOADES, R. A., AND G.A. TANNER (2003). *Medical physiology*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- RILEY, E. M., COUPER, K. N., HELMBY, H., HAFALLA, J. C., DE SOUZA, J. B., LANGHORNE, J., JARRA, W. B. and ZAVALA, F. (2010). Neuropathogenesis of human and murine malaria. *Trends Parasitol*, **26**, 277-278.
- ROMERO, C., BENEDI, J., VILLAR, A. and MARTIN-ARAGON, S. (2010). Involvement of Hsp70, a stress protein, in the resistance of long-term culture of PC12 cells against sodium nitroprusside (SNP)-induced cell death. *Arch Toxicol*, **84**, 699-708.
- ROSENTHAL, P. J. (2008). Artesunate for the treatment of severe falciparum malaria. *N Engl J Med*, **358**, 1829-1836.
- ROWE, J. A., CLAESSENS, A., CORRIGAN, R. A. and ARMAN, M. (2009). Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*, **11**, e16.
- RUBINSZTEIN, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, **443**, 780-786.
- RUPRECHT, K., STADELMANN, C., HUMMEL, V., KLEIN, O., BRUCK, W. and RIECKMANN, P. (2002). Brain derived neurotrophic factor does not act on adult human cerebral endothelial cells. *Neurosci Lett*, **330**, 175-178.

- SACHS, J. and MALANEY, P. (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature*, **415**, 680-685.
- SADANAND, S. (2011). Malaria: an evaluation of the current state of research on pathogenesis and antimalarial drugs. *Yale J Biol Med*, **83**, 185-191.
- SANNI, L. A., FU, S., DEAN, R. T., BLOOMFIELD, G., STOCKER, R., CHAUDHRI, G., DINAUER, M. C. and HUNT, N. H. (1999). Are reactive oxygen species involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? *J Infect Dis*, **179**, 217-222.
- SANTOS, A. R., COMPRIDO, D. and DUARTE, C. B. (2010). Regulation of local translation at the synapse by BDNF. *Prog Neurobiol*, **92**, 505-516.
- SAWADA, M., IMAMURA, K. and NAGATSU, T. (2006). Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, **70**, 373-381.
- SCHLUESENER, H. J., KREMSNER, P. G. and MEYERMANN, R. (2001). Heme oxygenase-1 in lesions of human cerebral malaria. *Acta Neuropathol*, **101**, 65-68.
- SCHOFIELD, L. and GRAU, G. E. (2005). Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, **5**, 722-735.
- SCHUMANN, R. R. (2007). Malarial fever: hemozoin is involved but Toll-free. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1743-1744.
- SEIFERT, U. and KRUGER, E. (2008). Remodelling of the ubiquitin-proteasome system in response to interferons. *Biochem Soc Trans*, **36**, 879-884.
- SEIN, K. K., MAENO, Y., THUC, H. V., ANH, T. K. and AIKAWA, M. (1993). Differential sequestration of parasitized erythrocytes in the cerebrum and cerebellum in human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*, **48**, 504-511.
- SEO, H., KIM, W. and ISACSON, O. (2008). Compensatory changes in the ubiquitin-proteasome system, brain-derived neurotrophic factor and mitochondrial complex II/III in YAC72 and R6/2 transgenic mice partially model Huntington's disease patients. *Hum Mol Genet*, **17**, 3144-3153.
- SERGHIDES, L., SMITH, T. G., PATEL, S. N. and KAIN, K. C. (2003). CD36 and malaria: friends or foes? *Trends Parasitol*, **19**, 461-469.
- SERRANO, F. and KLANN, E. (2004). Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev*, **3**, 431-443.
- SHACTER, E. (2000a). Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*, **319**, 428-436.
- SHACTER, E. (2000b). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev*, **32**, 307-326.
- SHERMAN, I. W., EDA, S. and WINOGRAD, E. (2003). Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes Infect*, **5**, 897-909.
- SIEGEL, G. J., AGRANOFF, B. W., ALBERS, W., FISHER, S. K. and UHLER, M. D. (1999). *Basic Neurochemistry*, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- SILVIE, O., MOTA, M. M., MATUSCHEWSKI, K. and PRUDENCIO, M. (2008). Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr Opin Microbiol*, **11**, 352-359.
- SINGH, N. R., RONDEAU, P., HOAREAU, L. and BOURDON, E. (2007). Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin. *Free Radic Res*, **41**, 1078-1088.
- SLEIGH, M. (1979). *Biología de los Protozoos*, Blume, Madrid.

- SMITH, L. A., BRUCE, J., GUEYE, L., HELOU, A., DIALLO, R., GUEYE, B., JONES, C. and WEBSTER, J. (2010). From fever to anti-malarial: the treatment-seeking process in rural Senegal. *Malar J*, **9**, 333.
- SOMMERFELD, M. T., SCHWEIGREITER, R., BARDE, Y. A. and HOPPE, E. (2000). Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an involvement of the proteasome and differential regulation of TrkA and TrkB. *J Biol Chem*, **275**, 8982-8990.
- STEVENSON, M. M., GROS, P., OLIVIER, M., FORTIN, A. and SERGHIDES, L. (2010). Cerebral malaria: human versus mouse studies. *Trends Parasitol*, **26**, 274-275.
- STOHWASSER, R., GIESEBRECHT, J., KRAFT, R., MULLER, E. C., HAUSLER, K. G., KETTENMANN, H., HANISCH, U. K. and KLOETZEL, P. M. (2000). Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Glia*, **29**, 355-365.
- STURM, A., AMINO, R., VAN DE SAND, C., REGEN, T., RETZLAFF, S., RENNENBERG, A., KRUEGER, A., POLLOK, J. M., MENARD, R. and HEUSSLER, V. T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, **313**, 1287-1290.
- SULTANA, R., BOYD-KIMBALL, D., POON, H. F., CAI, J., PIERCE, W. M., KLEIN, J. B., MERCHANT, M., MARKESBERY, W. R. and BUTTERFIELD, D. A. (2006). Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiol Aging*, **27**, 1564-1576.
- TAKEDA, M., KIKUCHI, M., UBALEE, R., NA-BANGCHANG, K., RUANGWEERAYUT, R., SHIBAHARA, S., IMAI, S. and HIRAYAMA, K. (2005). Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. *Jpn J Infect Dis*, **58**, 268-271.
- TALENT, J. M., KONG, Y. and GRACY, R. W. (1998). A double stain for total and oxidized proteins from two-dimensional fingerprints. *Anal Biochem*, **263**, 31-38.
- TAOUFIQ, Z., PINO, P., DUGAS, N., CONTI, M., TEFIT, M., MAZIER, D. and VOULDOUKIS, I. (2006). Transient supplementation of superoxide dismutase protects endothelial cells against Plasmodium falciparum-induced oxidative stress. *Mol Biochem Parasitol*, **150**, 166-173.
- TAYLOR, T. E. (2009). Caring for children with cerebral malaria: insights gleaned from 20 years on a research ward in Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **103 Suppl 1**, S6-10.
- TAYLOR, T. E., FU, W. J., CARR, R. A., WHITTEN, R. O., MUELLER, J. S., FOSIKO, N. G., LEWALLEN, S., LIOMBA, N. G. and MOLYNEUX, M. E. (2004). Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med*, **10**, 143-145.
- TEZEL, G., YANG, X. and CAI, J. (2005). Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46**, 3177-3187.
- THOMAS, B. and BEAL, M. F. (2007). Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, **16 Spec No. 2**, R183-194.
- THUMWOOD, C. M., HUNT, N. H., COWDEN, W. B. and CLARK, I. A. (1989). Antioxidants can prevent cerebral malaria in Plasmodium berghei-infected mice. *Br J Exp Pathol*, **70**, 293-303.
- TÓRTORA, G., AND S. REYNOLDS (2002). *Principios de anatomía y fisiología*, Oxford University Press, México.

- TOURE, F. S., OUWE-MISSI-OUKEM-BOYER, O., BISVIGOU, U., MOUSSA, O., ROGIER, C., PINO, P., MAZIER, D. and BISSER, S. (2008). Apoptosis: a potential triggering mechanism of neurological manifestation in *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite Immunol*, **30**, 47-51.
- TRIPATHI, A. K., SULLIVAN, D. J. and STINS, M. F. (2006). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. *Infect Immun*, **74**, 3262-3270.
- TURNER, G. D., MORRISON, H., JONES, M., DAVIS, T. M., LOOAREESUWAN, S., BULEY, I. D., GATTER, K. C., NEWBOLD, C. I., PUKRITAYAKAMEE, S., NAGACHINTA, B. and ET AL. (1994). An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol*, **145**, 1057-1069.
- UDEINYA, I. J., SCHMIDT, J. A., AIKAWA, M., MILLER, L. H. and GREEN, I. (1981). *Falciparum* malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. *Science*, **213**, 555-557.
- UDOMSANGPETCH, R., WAHLIN, B., CARLSON, J., BERZINS, K., TORII, M., AIKAWA, M., PERLMANN, P. and WAHLGREN, M. (1989). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. *J Exp Med*, **169**, 1835-1840.
- VAN DER HEYDE, H. C., NOLAN, J., COMBES, V., GRAMAGLIA, I. and GRAU, G. E. (2006). A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol*, **22**, 503-508.
- VIGARIO, A. M., BELNOUE, E., GRUNER, A. C., MAUDUIT, M., KAYIBANDA, M., DESCHEMIN, J. C., MARUSSIG, M., SNOUNOU, G., MAZIER, D., GRESSER, I. and RENIA, L. (2007). Recombinant human IFN-alpha inhibits cerebral malaria and reduces parasite burden in mice. *J Immunol*, **178**, 6416-6425.
- VIKMAN, K. S., OWE-LARSSON, B., BRASK, J., KRISTENSSON, K. S. and HILL, R. H. (2001). Interferon-gamma-induced changes in synaptic activity and AMPA receptor clustering in hippocampal cultures. *Brain Res*, **896**, 18-29.
- VOGT, A. M., BARRAGAN, A., CHEN, Q., KIRONDE, F., SPILLMANN, D. and WAHLGREN, M. (2003). Heparan sulfate on endothelial cells mediates the binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes via the DBL1alpha domain of PfEMP1. *Blood*, **101**, 2405-2411.
- VUTSKITS, L., DJEBBARA-HANNAS, Z., ZHANG, H., PACCAUD, J. P., DURBEC, P., ROUGON, G., MULLER, D. and KISS, J. Z. (2001). PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur J Neurosci*, **13**, 1391-1402.
- WAKNINE-GRINBERG, J. H., MCQUILLAN, J. A., HUNT, N., GINSBURG, H. and GOLENSER, J. (2010). Modulation of cerebral malaria by fasudil and other immune-modifying compounds. *Exp Parasitol*, **125**, 141-146.
- WARRELL, D. A. (1989). Cerebral malaria. *Q J Med*, **71**, 369-371.
- WARRELL, D. A., AND GILLES, H.M. (2002). *Essential malariology*, 4th edn. Arnold, London.
- WATERHOUSE, E. G. and XU, B. (2009). New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci*, **42**, 81-89.

- WEISER, S., MIU, J., BALL, H. J. and HUNT, N. H. (2007). Interferon-gamma synergises with tumour necrosis factor and lymphotoxin-alpha to enhance the mRNA and protein expression of adhesion molecules in mouse brain endothelial cells. *Cytokine*, **37**, 84-91.
- WHITE, N. J. and HO, M. (1992). The pathophysiology of malaria. *Adv Parasitol*, **31**, 83-173.
- WHITE, N. J., TURNER, G. D., MEDANA, I. M., DONDORP, A. M. and DAY, N. P. (2010). The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol*, **26**, 11-15.
- WHO (2007). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.
- WHO (2008). World Malaria Report 2008. World Health Organization. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563697_eng.pdf.
- WHO (2009). World Malaria Report. World Health Organization. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf.
- WIESE, L., KURTZHALS, J. A. and PENKOWA, M. (2006). Neuronal apoptosis, metallothionein expression and proinflammatory responses during cerebral malaria in mice. *Exp Neurol*, **200**, 216-226.
- WILLIMANN, K., MATILE, H., WEISS, N. A. and IMHOF, B. A. (1995). In vivo sequestration of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes: a severe combined immunodeficiency mouse model for cerebral malaria. *J Exp Med*, **182**, 643-653.
- WINKELSTEIN, B. A. and KRAS, J. V. (2010). Is there an antinociceptive role for peripheral brain-derived neurotrophic factor? *Spine J*, **10**, 733-735.
- WINZELER, E. A. (2006). Applied systems biology and malaria. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 145-151.
- WU, C., ZHANG, W., MAI, K., XU, W. and ZHONG, X. (2011). Effects of dietary zinc on gene expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in hepatopancreas of abalone Haliotis discus hannai. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **154**, 1-6.
- XU, X. M., LIN, H., MAPLE, J., BJORKBLUM, B., ALVES, G., LARSEN, J. P. and MOLLER, S. G. (2010). The Arabidopsis DJ-1a protein confers stress protection through cytosolic SOD activation. *J Cell Sci*, **123**, 1644-1651.
- ZAPATA-ZAPATA, C. H. and BLAIR-TRUJILLO, S. (2003). Malaria Cerebral. *IATREIA*, **16**, 202-216.
- ZHOU, W., BERCURY, K., CUMMISKEY, J., LUONG, N., LEBIN, J. and FREED, C. R. (2011). Phenylbutyrate upregulates DJ-1 and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson's disease. *J Biol Chem*, **286**, 14941-14951.
- ZUCCATO, C. and CATTANEO, E. (2009). Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*, **5**, 311-322.

